

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**Participação de Receptores Toll-Like 2 e 4, Citocinas e Quimiocinas
na Hipernocicepção Mecânica em um Modelo de Inflamação
Articular**

Ana Tereza Gomes Guerrero

**Ribeirão Preto
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**Participação de Receptores Toll-Like 2 e 4, Citocinas e Quimiocinas
na Hipernocicepção Mecânica em um Modelo de Inflamação
Articular**

Ana Tereza Gomes Guerrero

**Tese apresentada ao Departamento de
Farmacologia da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo como requisito para a obtenção do
grau de Doutor em Ciências.**

Área de concentração: Farmacologia.

**Orientador:
Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira.**

**Co-orientador:
Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha.**

**Ribeirão Preto
2008**

Ficha Catalográfica

Guerrero, Ana Tereza Gomes.

Participação de receptores TOLL-LIKE 2 e 4, citocinas e quimiocinas na resposta hipernociceptiva articular em um modelo de inflamação articular / Ana Tereza Gomes Guerrero; orientador Sérgio Henrique Ferreira; co-orientador Fernando de Queiroz Cunha.

Ribeirão Preto, 2008.

215 f. il. 30cm.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-graduação em Ciências. Área de concentração: Farmacologia). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo –FMRP/USP.

Palavras-chaves: citocinas, quimiocinas, hipernocicepção articular, migração de neutrófilos, receptores toll-like, MyD88, MAL/TIRAP e TRIF.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Tereza Gomes Guerrero

Participação de receptores TOLL-LIKE 2 e 4, citocinas e quimiocina na resposta hipernociceptiva articular em um modelo de inflamação articular

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Farmacologia

Aprovada em 04/12/2008.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira
Instituição: FMRP-USP
Orientador

Prof. Dra. Danielle da Glória de Souza
Instituição: ICB -UFMG

Prof. Dra. Glória Emília Petto de Souza
Instituição: FMRP-USP

Prof. Dra. Leda Menescall
Instituição: FMRP-USP

Prof. Dra. Yara Cury
Instituição: Instituto Butantan

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FMRP-USP, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

Dedicatória

Aos meus pais, Manoel e Rosemary, pelo amor incondicional e por todo o apoio em mais esta jornada.

Agradecimientos

Ao Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira, pela orientação, confiança e a oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha, pela co-orientação, dedicação e oportunidade.

As Prof^a Dra. Danielle da Glória de Souza, Dra. Glória Emilia Petto de Souza, Dra. Leda Menescall e Dra. Yara Cury pela disponibilidade de participar da minha banca examinadora, por me atenderem prontamente com atenção, engrandecendo as discussões deste trabalho.

Ao prof. Dr. Ricardo Gazinelli, pela gentil doação dos animais deficientes para MAL/TIRAP e TRIF.

Aos meus amados irmãos Felipe Matheus, Rita de Cássia e Maria Luiza por todo o apoio e carinho nesta difícil jornada. Agradeço à Deus pela existência de vocês na minha vida.

Aos meus cunhados Leocir Viscovini e Laura Zimmerman por todo o apoio nestes últimos meses.

As minhas queridas amigas Cristiane Nava e Shara Nasralla que demonstraram amizade sincera e apoio em um momento tão difícil de minha vida.

Ao meu querido amigo Waldiceu Verri Jr, pela sua dedicação, competência e amizade que foram tão importantes nesta etapa de minha vida. Um grande e eterno amigo que contribuiu muito para o meu amadurecimento científico.

Ao meu amigo Thiago Mattar Cunha, pelas valiosas sugestões na elaboração deste trabalho e pela amizade sincera.

As minhas queridas amigas, Daniela Dal Secco, Andressa de Freitas, Vânia Cláudia Olivon e Jozi Godoy pela amizade sincera e pelo apoio em todos os momentos.

A amiga Mirela Barros Dias pela amizade e aos anos de convívio.

Ao amigo Luis Fernando Ferrari, pela amizade e dedicação.

Ao amigo Guilherme Rabelo, pela amizade e carinho.

A todos os docentes do Departamento de Farmacologia da FMRP e FCFRP-USP por toda a atenção e ensinamentos.

Aos amigos do laboratório de Inflamação e Dor: Larissa, Henrique, Renata, Mani, Fernando, Sílvio, Paulo, Fabiane, Fabrício, Thiago Garlet, Paula, Daniele e Dany Carlos pela amizade e convívio.

Aos excelentes técnicos do laboratório de Inflamação e Dor: Ana Kátia dos Santos, Diva Amabile Montanha de Sousa, Fabíola Leslie A C. Mestriner, Ieda Regina dos Santos Schivo e Sérgio Roberto Rosa pela responsabilidade, amizade, dedicação, alegria e sábios ensinamentos que foram de extrema importância para a realização deste trabalho. A todos vocês meus amigos queridos, muito obrigada.

Aos amigos Valéria Cristina Squissato e Acácio Antunes Cardoso pela constante dedicação e amizade na resolução de assuntos burocráticos e financeiros.

Ao querido amigo José Valdick Ramon pela amizade, alegre convivência, atenção e competência na resolução de problemas burocráticos.

Aos amigos e colegas do DOL, pelas discussões e enriquecimento científico.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, pelo convívio e amizade, com certeza a cada um destes devo um agradecimento especial, muito obrigada.

As secretárias do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP: Fátima Helena Petean e Sônia Maria Stefanelli pela dedicação e competência nas resoluções burocráticas.

Aos bioteristas, Júlio Siqueira, Rubinho, Maria Inês Castrechini Nemoto e Eliana Beatriz Castrechini de Barros, pelo carinho e cuidado dos animais do biotério.

A todos os funcionários de Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, pela competência e dedicação.

A Mauro Sergio Secco pelo excelente trabalho computacional e artístico.

A FAPESP pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

“A diferença básica entre um guerreiro e um homem comum, é que o primeiro toma tudo como um desafio, enquanto o outro toma tudo como desgraça ou benção divina.”

Carlos Castañeda

Sumário e Lista

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS.....	xiv
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xxi
1 INTRODUÇÃO.....	24
1.1 Dor Inflamatória.....	24
1.2 Recrutamento Leucocitário	34
1.3 Artrite e o modelo de inflamação articular tíbio-tarsal	36
1.4 Receptores Toll-like	41
2 OBJETIVOS.....	46
2.1 Objetivo geral.....	46
2.2 Objetivos específicos	46
3 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 Animais	48
3.2 Avaliação Nociceptiva	48
3.3 Indução da Inflamação na Articulação Tíbio-Tarsal	52
3.4 Quantificação da Migração de Neutrófilos para o Tecido Articular	53
3.5 Dosagem de Citocinas Envolvidas na Hipernocicepção Inflamatória Articular.....	54
3.6 Avaliação Farmacológica dos Mediadores Envolvidos nos Efeitos Nociceptivos e Migração de Neutrófilos.....	55
3.7 Protocolos Experimentais	56
3.8 Drogas e Reagentes	56
3.9 Análise Estatística.....	57

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	A resposta hipernociceptiva articular e a migração leucocitária articular induzidas pelo zimosan em camundongos dependem da atuação dos receptores toll-like 2 (TRL-2) e molécula MyD88	59
4.2	A hipernocicepção e a migração de neutrófilos articular induzidas pelo zimosan são dependentes da ação do TNF- α via receptor TNFR1 (p55) em camundongos	70
4.3	A hipernocicepção e a migração neutrofilica articular induzidas pelo zimosan são dependentes da ação de IL-1 β em camundongos.....	76
4.4	A resposta hipernociceptiva e a migração neutrofilica articular induzidas pelo zimosan em camundongos dependem da quimiocina KC.....	81
4.5	O efeito hipernociceptivo articular induzido pelo LPS em camundongos é dose-tempo-dependente	87
4.6	O efeito hipernociceptivo articular induzido pelo LPS em camundongos é dependente de receptores TOLL-LIKE 4	94
4.7	O efeito hipernociceptivo articular induzido pelo LPS em camundongos é dependente das moléculas adaptadoras MyD88 e MAL/TIRAP, mas é independente de TRIF	101
4.8	TNF- α induz hipernocicepção mecânica articular em camundongos: Papel de quimiocinas CXCR1/2, IL-1 β , aminas simpáticas e prostaglandinas ..	112
4.9	A quimiocina KC induz hipernocicepção mecânica articular em camundongos: papel de TNFR1, IL-1 β , prostaglandinas e aminas simpáticas .	122
4.10	IL-1 β induz hipernocicepção mecânica articular em camundongos: Papel de TNF- α , KC, prostaglandinas e aminas simpáticas	130
4.11	A administração intra-articular de TNF- α , IL-1 β e KC induz migração neutrofilica articular e hipernocicepção mecânica articular que são inibidas pela fucoidina.....	139
5	CONCLUSÕES	148
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151

ANEXOS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

(-/-): deficientes homozigotos

µg: micrograma – 10^{-6} do grama

µL: microlitros – 10^{-6} do litro

5-LO: 5-lipoxigenase

Aδ: fibras A delta

AA: ácido araquidônico

AINES: antiinflamatórios não-esteroidais

AMPC: adenosina monofosfato cíclico

BaCl₂: cloreto de bário

BK: bradicinina

BN50730: antagonista do receptor para PAF

C3a: terceiro fragmento do sistema complemento ativado

C5a: quinto fragmento do sistema complemento ativado

Ca⁺²: íon cálcio

CFA: adjuvante completo de Freund's

Cg: carragenina

CINC-1: quimiocina quimioatraente de neutrófilo induzida por citocina-1

COX: enzima cicloxigenase

COX-1: enzima cicloxigenase isoforma 1

COX-2: enzima cicloxigenase isoforma 2

CP105696: antagonista do receptor para LTB₄

DAG: diacilglicerol

DNA: ácido desoxirribonucléico

e.p.m.: erro padrão da média

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EIA: ensaio imunoenzimático

EP: receptor para PGE₂

EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄: receptores para prostaglandinas (1, 2, 3 e 4)

E-selectina: selectina endotelial

ET-1: endotelina-1

ET_A e ET_B: receptores dos tipos A e B para endotelinas

ETs: endotelinas

FLAP: proteína ativadora da 5-LO

g: gramas

GMPc: guanosina monofosfato cíclico

GRO: gene relacionado à oncogene (growth-related-oncogene)

h: hora

hs: horas

i.art.: intraarticular

IASP: Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain*)

i.p.: intraperitoneal

i.pl.: intraplantar

i.v.: intravenosa

ICAM-1: molécula de adesão intracelular 1

IL-1 β : interleucina 1 β

IL-18: interleucina 18

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

IP₃: inositol trifosfato

IRAK-1: receptor associado a quinase 1

IRAK-4: receptor associado a quinase 4

KC: quimiocina derivada de queratinócitos

Kg: quilograma

LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*

L-selectina: selectina leucocitária

LTB₄: leucotrieno B₄

LTs: leucotrienos

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MAL/TIRAP: adaptador tipo MyD88

mg: miligrama

mg: miligramas

mL: mililitro

mm²: milímetros cúbicos

MPO: mieloperoxidase

MyD88: diferenciador mielóide
NGF: Fator de Crescimento do Nervo
 O_2^- : ânion superóxido
OVA: ovalbumina
PAF: fator ativador plaquetário
PAGPC: 1-palmitoil-2-acetil-GPC
PECAM: molécula de adesão celular endotelial e plaquetária
Pg: picogramas
 PG_2 : prostaglandinas E_2
 PGI_2 : prostaciclina
PI3K fosfatidilinositol 3 kinase
 PIP_2 : fosfatidil-4,5-bifosfato
PKA: proteína quinase dependente de AMPc
PKC: proteína quinase dependente da fosfolipase C
 PLA_2 : fosfolipase A2
 PLA_2c : fosfolipase A2 citosólica
PLC: fosfolipases
PMN: polimorfonucleares
P-selectina: selectina plaquetária
RNAm: ácido ribonucléico mensageiro
s.c.: subcutânea
TRAF-6: receptor associado ao fator 6
 $TNF\alpha$: fator de necrose tumoral-alfa
TNF-R1: receptor do TNF
TRIF: adaptador indutor interferon- β
v.o.: via oral
VCAM-1: molécula de adesão vascular 1

Resumo

RESUMO

GUERRERO, AT. **Participação de receptores TOLL-LIKE 2 e 4, citocinas e quimiocinas na resposta hipernociceptiva articular em um modelo de inflamação articular.** 2008. 215 p. Tese- Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Existem evidências experimentais e clínicas da participação de diferentes receptores e mediadores no desenvolvimento e manutenção da artrite reumatóide Corroborando o caráter multifatorial dessa patologia, cerca de 30% dos pacientes não respondem a terapia anti-TNF- α . Dessa forma, a investigação dos mediadores envolvidos na patogênese da artrite pode contribuir para abordagens terapêuticas mais eficientes. Além disso, apesar da dor articular ser um dos sintomas clínicos mais importantes dessa doença devido à incapacitação motora ainda existe um longo caminho para sua compreensão. Dados da literatura demonstram a participação das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-18, quimiocinas KC e MIP-1 α , e receptores TRL-2 e TRL-4 em quadros de artrite tanto em animais quanto em humanos. Assim, como a artrite reumatóide é caracterizada pela intensa dor articular e infiltrado inflamatório crônico no tecido sinovial, este estudo teve por objetivo investigar o efeito nociceptivo articular e a migração leucocitária articular, bem como a inter-relação entre esses efeitos e a hierarquia entre os mediadores envolvidos neste modelo de inflamação articular. Primeiramente, detectou-se que a injeção intra-articular de zimosan ou LPS induziu resposta hipernociceptiva mecânica articular. A hipernocicepção mecânica articular induzida por zimosan ou LPS foi inibida pelo pré-tratamento com um antagonista de receptores CXCR1/2- DF2162 e IL1Ra. Ademais, a hipernocicepção articular induzida por zimosan ou LPS foi reduzida em camundongos deficientes para o receptor p55 do TNF- α , Toll-like 2, deficientes na via de sinalização para Toll-like 4 e molécula MyD88. Ao avaliar a migração leucocitária articular utilizando o método da mieloperoxidase (MPO) observou-se redução da migração leucocitária articular tanto nos tratamentos quanto nos animais deficientes acima mencionados. Assim, esses resultados sugerem uma correlação entre resposta hipernociceptiva articular e migração leucocitária articular. Além disso, para confirmar a participação de TNF- α , IL-1 β e KC utilizando a técnica de ELISA foram detectadas a presença significativa destas citocinas nos tempos de 3-5 horas após injeção intra-articular de zimosan ou LPS. Ademais, observou-se que o TNF- α , IL-1 β e KC induziram resposta hipernociceptiva articular de maneira dose-tempo-dependentes. A hipernocicepção articular induzida pelo TNF- α IL-1 β e KC foram parcialmente inibida pelo pré-tratamento com indometacina, guanetidina, associação entre indometacina e guanetidina , IL-1Ra e DF2162.

Além disso, detectou-se que animais deficientes para o receptor TNFRI do TNF- α apresentaram redução da resposta hipernociceptiva articular. Dando continuidade ao estudo, foi detectado que a administração intra-articular de TNF- α induziu a produção de IL-1 β e quimiocina KC. De maneira complementar, as concentrações de TNF- α e IL-1 β estavam elevadas nas articulações de animais que receberam administração intra-articular de KC. Também foi observado que a administração intra-articular de IL-1 β induziu aumento das concentrações articulares de TNF- α e quimiocina KC. Avaliando-se os resultados acima descritos podem-se sugerir a participação de prostanóides, aminas simpáticas, TNF- α agindo via receptores TNFRI, IL-1 β e KC. Em conjunto, os resultados acima descritos, sugerem o conceito de que na resposta hipernociceptiva articular induzida pelo TNF- α , IL-1 β e quimiocina KC, estas citocinas e quimiocina estão agindo de maneira retro-alimentativa ou se auto-regulando e também precedem a liberação dos mediadores finais da hipernocicepção inflamatória (prostanóides e aminas simpáticas). O segundo objetivo deste estudo foi investigar a existência de uma inter-relação entre o fenômeno hipernociceptivo articular e a migração leucocitária articular induzidas pelas citocinas (TNF- α e IL-1 β) e quimiocina KC. E observou-se que estes mediadores pró-nociceptivos apresentaram aumento da migração leucocitária articular. Foi observado que o pré-tratamento com fucoidina (inibidor da migração leucocitária) inibiu tanto a resposta hipernociceptiva articular induzida pelo TNF- α , IL-1 β e KC quanto a migração leucocitária articular induzida pelo TNF- α , IL-1 β e KC. Assim, esses resultados sugerem uma correlação entre resposta hipernociceptiva articular e migração leucocitária articular induzidas pelo TNF- α , IL-1 β e quimiocina KC. Concluindo, este trabalho contribuiu para a elucidação, pelo menos em parte, dos mecanismos envolvidos na resposta hipernociceptiva articular induzida pelo zimosan (agonista toll-like 2) e LPS (agonista toll-like 4). Além de sugerir que as citocinas TNF- α e IL-1 β e quimiocina KC estão agindo de maneira retro-alimentativa neste modelo de inflamação articular.

Palavras-Chave: citocinas, quimiocinas, hipernocicepção articular, migração de neutrófilos, receptores toll-like, MyD88, MAL/TIRAP, TRIF.

Abstract

ABSTRACT

GUERRERO, AT. **Participation of TOLL-LIKE 2 and 4 receptors, cytokines and chemokines in the articular mechanical hypernociceptive response in an articulation inflammation model.** 2008. 215 p. Thesis – Department of Pharmacology of the College of Medicine of Ribeirao Preto – University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP.

There is experimental and clinical evidence of the participation of different receptors and mediators in the development and maintenance of rheumatoid arthritis. Corroborating the multifactorial character of this pathology, approximately 30% of the patients do not answer the anti-TNF- α therapy. Thus, the investigation of the mediators involved in the arthritis pathogenesis may contribute to develop more efficient therapeutic approaches. Furthermore, although the articular pain is among the most important of the clinical symptoms of this disease because of the resulting motor inability, there is still a long way until it can be understood. Data in the literature show that the participation of TNF- α , IL-1 β , IL-18 cytokines, KC and MIP-1 α chemokines, and TRL-2 and TRL-4 receptors in arthritis both in animals and humans. Thus, as rheumatoid arthritis is characterized by an intense articular pain and severe inflammatory infiltration in the synovial tissue, this study aimed to investigate the articular nociceptive effect and the articular leukocyte migration, as well as the articular interrelation between these effects and the hierarchy of the mediators involved in this articular inflammation model. Firstly, it was detected that the intra-articular zymosan or LPS injection induced an articular mechanical hypernociceptive response. The articular mechanical hypernociceptive response induced by zymosan or LPS injection was inhibited by the pre-treatment with an antagonist of CXCR1/2- DF2162 and IL1Ra receptors. Moreover, the articular hypernociception induced by zymosan or LPS was reduced in deficient mice for the p55 of the TNF- α receptor, Toll-like 2, deficient signaling via for Toll-like 4 and MyD88 molecule. Through the assessment of articular leukocyte migration by means of myeloperoxidase (MPO), it was observed a reduction of the articular leukocyte migration both in the treatment and in the deficient animals mentioned above. Thus, these results suggest a correlation between the articular hypernociceptive response and the articular leukocyte migration. Apart from that, in order to confirm the participation of TNF- α , IL-1 β and KC using the ELISA technique, a significant production of these cytokines was detected between 3-5 hours after the intra-articular zymosan or LPS injection. It was also observed that TNF- α , IL-1 β and KC induced articular hypernociceptive response in a dose-time-dependent pattern. The articular hypernociception induced by TNF- α IL-1 β and KC was partially inhibited by the pre-treatment with indomethacin, guanethidine, indomethacin and

guanethidine association, IL-1Ra and DF2162. Furthermore, it was detected that animals deficient in the TNFR1 receptor of the TNF- α showed a reduction in the articular hypernociceptive response. Continuing the study, it was observed that the intra-articular administration of TNF- α induced the production of IL-1 β and KC chemokine. Additionally, the TNF- α and IL-1 β concentrations were high in the articulations of animals that received intra-articular administration of KC. It was also observed that the intra-articular administration of IL-1 β induced an increase in articular concentrations TNF- α and KC chemokine. Assessing the results described above may suggest the participation of prostanoids, sympathetic amines, TNF- α acting through TNFR1, IL-1 β and KC. Together, the results described above suggest that the concept that in the articular hypernociceptive response induced by TNF- α , IL-1 β and KC chemokine, these cytokines and chemokine are acting in a cyclic way or they are self-relating and also precede the liberation of the final mediators of the inflammatory hypernociception (e.g. prostanoids and sympathetic amines). The second aim of this study was to investigate the existence of an interrelation between the articular hypernociceptive phenomenon and the articular leukocyte migration induced by cytokines (TNF- α and IL-1 β) and KC chemokine. It was observed that these pro-nociceptive mediators induced an increase in the articular leukocyte migration. The treatment with fucoidin (leukocyte migration inhibitor) not only inhibited the articular hypernociceptive response induced by TNF- α , IL-1 β and KC, but also the articular leukocyte migration induced by TNF- α , IL-1 β and KC. Thus, these results suggest a correlation between the articular hypernociceptive response and the leukocyte migration induced by TNF- α , IL-1 β and KC chemokine. In conclusion, this study contributed to elucidate, at least partially, of the mechanisms involved in articular hypernociceptive response induced by zymosan (agonist toll-like 2) and LPS (agonist toll-like 4). It also suggests that cytokines TNF- α , IL-1 β and KC chemokine are acting in a cyclic way in this articular inflammation model.

Key Words: cytokines, chemokines, articular hypernociception, migration of neutrophil, toll-like receptors, MyD88, MAL/TIRAP, TRIF.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor Inflamatória

A definição de dor mais aceita é endossada pela Associação Internacional para o Estudo de Dor (IASP) “como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou não a uma lesão tecidual” (MERSKEY e BOGDUK, 1994). Contudo, Ferreira¹(2004) define dor como sendo, “uma sensação nociceptiva induzida em um tecido normal ou lesionado por estímulos físicos e/ou químicos de origem endógena e/ou exógena, assim como por disfunções patológicas e/ou psicológicas, cuja percepção causa emoções desagradáveis e/ou comportamentos aversivos”.

A dor sempre foi interpretada pelo homem como um flagelo. O homem primitivo associava a dor à presença de espíritos malignos ou fluídos mágicos no organismo. Já Aristóteles defendia a idéia de que a dor era uma experiência oposta ao prazer, e Descartes evidenciou a existência de vias nervosas específicas que seriam responsáveis pela condução de informações sensoriais periféricas até o cérebro. Desde a idade média a dor é considerada como sensação de alerta e proteção do organismo contra o dano físico (para revisão ver PRADO, 1999). Até os dias atuais, a dor é considerada como uma função protetora, a qual informa as condições em que se encontram o meio interno e externo do organismo.

Segundo, Tauschke et al., (1991), a dor apresenta caráter subjetivo e pode ser compreendida pela identificação de quatro categorias clínicas: nocicepção, percepção de dor, sofrimento e comportamento da dor. Por trás de cada uma destas categorias estão substratos anatômicos, fisiológicos e psicológicos (LOESER, 1980). Corroborando estas observações Brandão (2002), descreve que o fenômeno da dor é constituído de dois componentes: o componente perceptivo-discriminativo, no qual o organismo identifica o estímulo doloroso e o componente aversivo-cognitivo-motivacional, no qual o organismo apresenta respostas defensivas, tais como retirada reflexa do membro e até mesmo respostas emocionais complexas do tipo luta/fuga.

¹ Conceito defendido pelo prof. Dr. Sergio Henrique Ferreira.

Outra forma de classificar a dor foi proposta por Melzack e Wall (1965), que destaca as diferenças entre dor aguda e crônica. A dor aguda apresenta função de alertar o indivíduo sobre a ocorrência de lesão tecidual local e, assim, diminuir o dano. Neste caso, o organismo é capaz de restabelecer o equilíbrio até mesmo sem necessitar de intervenção médica. Por outro lado, a dor crônica é caracterizada pela presença de lesão tecidual ou doenças e outros fatores que perpetuam o quadro, incapacitando o organismo de restabelecer a homeostasia (LOESER e MELZACK, 1999).

Para que ocorra a percepção dolorosa pelo sistema nervoso central é necessária à ativação de receptores sensoriais especializados chamados nociceptores, que são terminações nervosas livres de neurônios pseudo-unipolares, cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios das raízes dorsais e nos gânglios trigeminais (KANDEL et al., 2000). Estas estruturas possuem limiares de ativação específicos que os distinguem de outros tipos de receptores mecânicos e térmicos, uma vez que são excitáveis apenas por estímulos como calor nocivo, pressão intensa ou substâncias químicas irritantes, mas não por estímulos não nocivos como luz e toque (JULIUS e BASBAUM, 2001). Assim, quando é aplicado um estímulo doloroso, a informação nociceptiva é convertida em potenciais de ação pelos nociceptores e transmitida pelos nervos espinais e cranianos à medula espinal ou tronco encefálico. Dessa forma, através das fibras aferentes primárias, que são os axônios dos nociceptores, ocorre a transmissão da informação nociceptiva da periferia para o cérebro (RANGE et al., 1996).

Existem duas classes principais de fibras aferentes primárias: fibras A delta ($A\delta$), as quais são finas e mielinizadas, e apresentam velocidade de condução de 5 a 30 m/s, e as fibras C, que são mais finas e não mielinizadas, com velocidade de condução de cerca de 1 m/s. As fibras $A\delta$ respondem apenas a estímulos nocivos mecânicos e térmicos, enquanto as fibras C respondem a estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos sendo, por isso chamadas de polimodais (RANGE et al., 1996, JULIUS e BASBAUM, 2001).

É importante resaltar, de maneira simplificada, que um estímulo nociceptivo na periferia é reconhecido por moléculas sinalizadoras específicas (TRPV1 etc) presentes nos nociceptores (fibras $A\delta$ e C), convertida em impulsos elétricos e transmitida pelos nervos espinais e cranianos aos neurônios de segunda e terceira

ordem no sistema nervoso central. Os nociceptores que transmitem a informação nociceptiva de estruturas cranianas contraem sinapses diretamente com neurônios secundários, em núcleos no tronco cerebral. Os presentes nos membros e tronco conduzem a informação nociceptiva para o sistema nervoso central através da raiz dorsal da medula espinal, onde contraem sinapses com neurônios de segunda ordem. Estas sinapses ocorrem no corno dorsal da medula espinal na substância cinzenta, que é dividida em dez lâminas (REXED, 1954). Por exemplo, as lâminas I e II respondem, exclusivamente, à estimulação cutânea nociva. Enquanto, a maioria dos neurônios nas lâminas IV e V respondem à estimulação tátil. Além disso, um grupo de neurônios presentes, principalmente, na lâmina V, respondem tanto a estímulos de baixa quanto de alta intensidade, oriundos tanto de fibras de grande quanto de pequeno diâmetro. Esses são denominados neurônios de amplo espectro dinâmico de resposta (WDR) (WILSON, 1996). Portanto, após a informação nociceptiva ser propagada dos neurônios primários para os secundários e sofrer todas as modulações, ela ascende através de diferentes tratos nervosos específicos até as populações de neurônios no núcleo posterior ventral do tálamo, onde essa informação se projetará do tálamo para áreas sensoriais do córtex cerebral.

Um denominador comum de todos os tipos de dor inflamatória é a sensibilização dos nociceptores. Este fenômeno é resultado da liberação de mediadores químicos por vários tipos celulares residentes e migratórios no local da lesão tecidual. Enquanto, alguns mediadores atuam sensibilizando os nociceptores, ou seja, diminuindo o limiar de ativação, como as prostaglandinas (PG_2), prostaciclina (PGI_2), as aminas simpáticas e os leucotrienos (LTs), outros ativam diretamente os nociceptores, como, por exemplo, serotonina, histamina e bradicinina, causando imediata manifestação da dor (ARMSTRONG et al., 1957; SICUTERI et al., 1965; FERREIRA, 1972; WHALLEY et al., 1987; FLÓREZ, 1993). Como comentado anteriormente a liberação de mediadores químicos de várias origens celulares decorrentes da lesão tecidual local pode sensibilizar e/ou ativar diretamente os nociceptores (FLOREZ, 1993). Eletrofisiologicamente, a sensibilização dos nociceptores é caracterizada pela redução do limiar necessário para ativá-los, pelo aumento da atividade espontânea do neurônio e pelo aumento da frequência de disparos em resposta a estímulos supralimiais (REIDEL e NEECK, 2001).

Esta sensibilização dos nociceptores conduz a alterações plásticas nos neurônios que transmitem a nocicepção e são reponsáveis pelas modificações nas sensações dolorosas durante o processo inflamatório. A plasticidade neuronal pode ocorrer tanto em nível periférico quanto central. Ela é importante no aparecimento de dois fenômenos clinicamente relacionados a dor inflamatória: alodinia (dor decorrente de um estímulo que normalmente não provoca dor), e hiperalgesia (uma resposta exacerbada a um estímulo doloroso). No entanto, alodinia e hiperalgesia são termos utilizados para caracterizar a sensibilização no homem (FLÓREZ, 1993; RANGE et al., 1996; LOESER e MELZACK, 1999). Considerando que a percepção pelos nociceptores de um estímulo nocivo (ou potencialmente nocivo) e a transmissão dessa informação ao sistema nervoso central constitui o processo de nocicepção, é proposta, a utilização do termo nocicepção para animais experimentais em substituição ao termo dor, mais indicado para seres humanos, visto que nesses, há como discriminar o componente emocional (NOBACK et al., 1996). Além disso, nosso grupo vem trabalhando com o termo de hipernocicepção, que seria mais adequado para designar a redução do limiar de resposta comportamental nociceptiva do animal, que ocorre em virtude à sensibilização prévia do tecido.

Atualmente, tem sido proposto que a hipernocicepção é resultante da sensibilização dos neurônios sensitivos primários associados a nociceptores polimodais de alto limiar ou a nociceptores silenciosos. Esta classe de receptores presentes no tecido articular e em outros tecidos como o tecido visceral apresenta limiar de ativação muito elevado e, portanto, não são ativados por estímulos nocivos agudos (SCHAIBLE e SCHMIDT, 1988). Entretanto, a sensibilização destes nociceptores ocorre durante o processo inflamatório, como consequência da liberação de substâncias algésicas, tais como: prostaglandinas e bradicinina. O aumento do influxo sensorial resultante da sensibilização periférica dos nociceptores conduz à subsequente sensibilização do componente central, sendo este responsável por modificações na percepção da dor em tais circunstâncias (HANESCH et al., 1992; SCHAIBLE et al., 2002).

Hingtgen et al. (1995), demonstraram que a ligação da PGE₂, dopamina ou carba prostaciclina (análogo estável da prostaciclina) a seus receptores específicos induz aumento da concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclico

(AMPc) e cálcio (Ca^{+2}), causando a sensibilização dos nociceptores. Corroborando estes dados, Ferreira e Nakamura (1979), utilizando o teste de pressão constante na pata de ratos, observaram hipernocicepção mecânica após administração intraplantar de dibutilil AMPc (análogo do AMPc), de A23187 (ionóforo de Ca^{+2}) ou de cloreto de bário (BaCl_2), os quais levam ao aumento da concentração citoplasmática de Ca^{+2} . Estes resultados concordam com a observação de que receptores adrenérgicos e prostanóides estão acoplados à enzima adenilato ciclase, responsável pela síntese de AMPc (NAMBAL et al., 1994; HINGTGEN et al., 1995; SMITH et al., 1998).

Em vista desses resultados, o aumento de AMPc foi relacionado com a hipernocicepção inflamatória periférica (FERREIRA et al., 1990). Em contribuição a estes dados, Cunha et al. (1999b), utilizando o teste de pressão crescente na pata de ratos, observaram que níveis elevados de AMPc estão relacionados a hipernocicepção. Por outro lado, altos níveis de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) demonstram atividade antinociceptiva. Portanto, na hiperalgesia mecânica parece ocorrer um balanço entre os níveis de AMPc e GMPc, sendo que altos níveis de AMPc causam hipernocicepção, enquanto de GMPc antinocicepção.

Dos mediadores liberados durante o processo inflamatório responsáveis pela sensibilização dos nociceptores, talvez, os que tenham sido mais intensamente estudados na nocicepção inflamatória são as prostaglandina (PGE_2), prostaciclina (PGI_2) e as aminas simpáticas (FERREIRA et al., 1978; LEVINE et al., 1986; NAKAMURA e FERREIRA, 1987).

As prostaglandinas são metabólitos resultantes da ação da enzima cicloxigenase (COX) sobre o ácido araquidônico, o qual é produto da biotransformação dos fosfolípidos da membrana celular. Atualmente, sabe-se da existência de pelo menos duas isoformas da enzima COX. Sendo a COX-1 considerada constitutiva e a COX-2, a qual é induzida em tecidos periféricos por citocinas, fatores de crescimento ou por outros mediadores inflamatórios. No entanto, existem demonstrações de que em alguns tecidos como nos rins, o cérebro, os ovários e o útero, a COX-2 parece ser constitutiva (DINCHUK et al., 1995; MORHAM et al., 1995).

Ferreira (1972) foi o primeiro a demonstrar em humanos que as prostaglandinas, principalmente do tipo E_2 (PGE_2) causam hiperalgesia inflamatória.

A PGE₂ interage com seus receptores do tipo, EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄, os quais são acoplados a proteína G (NARUMIYA et al., 1999).

Foi demonstrado que os subtipos EP₁, EP₃ e EP₄ são expressos predominantemente em neurônios aferentes nociceptivos primários (OIDA et al., 1995), enquanto, que os EP₂ apresentam maior demonstração de sua expressão em neurônios da medula espinal (KAWAMURA et al., 1997). Barnes et al., (1998), relacionaram os receptores EP₁ à resposta nociceptiva. Recente estudo demonstrou a expressão de RNAm para os receptores EP₂ e EP₄ no tecido sinovial inflamado de ratos (KURIHARA et al., 2001). Omote et al., (2002), utilizando-se de um modelo de monoartrite em ratos desencadeada por adjuvante completo de Freund's (CFA), observaram inibição da hiperalgesia mecânica e térmica após administração intracapsular de agonista do receptor EP₄ (ONO-AEI-329), sugerindo que este subtipo de receptor pode estar relacionado à ação inibitória da hipernocicepção, ao contrário dos outros subtipos. Após a ligação da prostaglandina com seus receptores, ocorre liberação de inositol trifosfato, diacilglicerol, íon cálcio, os quais ativam proteína quinase dependente da fosfolipase C (PKC). Outro segundo mensageiro é a adenina monofosfato cíclico (AMPc), a qual irá ativar a proteína quinase dependente de AMPc (PKA).

Uma vez confirmada a capacidade das prostaglandinas de causar hipernocicepção, Nakamura e Ferreira (1987) demonstraram que outros mediadores como noradrenalina, adrenalina, isoprenalina, dopamina e tiramina, são capazes de induzir hipernocicepção de intensidade semelhante às prostaglandinas, através da ativação de receptores dopaminérgicos do tipo DA-1 e receptores beta-adrenérgicos, demonstrando assim a participação simpática na gênese da hipernocicepção inflamatória.

A capacidade das prostaglandinas e das aminas simpáticas (noradrenalina e dopamina) de sensibilizar os nociceptores tem sido demonstrada em humanos e animais usando tanto técnicas eletrofisiológicas quanto comportamentais (HANNINGTON-KIFF, 1974; LOL e NATHAN, 1978; LOL et al., 1980; FERREIRA, 1983; NAKAMURA e FERREIRA, 1987; DUARTE et al., 1988). Sendo que, a participação destes mediadores na nocicepção inflamatória foi demonstrada utilizando-se três métodos nociceptivos: o teste de pressão constante na pata de ratos (NAKAMURA e FERREIRA, 1987); o teste de contorções abdominais em

camundongos (DUARTE et al., 1988); e o teste de estimulação elétrica em cobaias (NAKAMURA e LICO, 1985).

Dentre os mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico (como as prostaglandinas), também se destacam os leucotrienos (LTs) e o fator ativador plaquetário (PAF) que são também mediadores nociceptivos derivados do metabolismo do ácido araquidônico pela 5-lipooxigenase. Um dos leucotrienos mais estudados em modelos inflamatórios é o leucotrieno B₄ (LTB₄). Sabe-se que o LTB₄ induz o acúmulo de neutrófilos devido à sua propriedade quimioatraente para polimorfonucleares (IWAMOTO et al., 1993; PETTIPHER et al., 1993), e produz hiperalgesia em humanos (BISGAARD e KRISTENSEN, 1985) e animais (LEVINE et al., 1984) sendo que a hiperalgesia induzida por LTB₄ parece ser dependente de leucócitos (LEVINE et al., 1984). Também foi demonstrado que a administração sub-plantar de PAF em ratos, apresentou uma redução do limiar nociceptivo (VARGAFTIG e FERREIRA, 1981; DALLOB et al., 1987), sugerindo a participação do PAF em processos hipernociceptivos.

Ainda em relação à hipernocicepção inflamatória, Ferreira (1989) foi o primeiro a demonstrar a participação das endotelinas (ETs) neste fenômeno. Para tal utilizou o modelo de pressão constante na pata de ratos, na qual a administração de endotelina-1 (ET-1) causou hipernocicepção, que não foi alterada pelo tratamento com indometacina (inibidor da COX) ou guanetidina, sugerindo um efeito independente das vias prostaglandínica e simpáticas nesse modelo. A administração intra-articular de ET-1 em cães causou incapacitação transitória, porém após administração de uma dose não efetiva de PGE₂ apresentou incapacitação intensa, sugerindo a possível participação de ET-1 em patologias inflamatórias.

Em modelos animais a administração de ET-1 produz hipernocicepção, ademais a ET-1 endógena é responsável por mediar a hipernocicepção observada em modelos de artrite (DE-MELO et al., 1998). Em concordância com estes achados Verri Jr et al., (2004) demonstraram a atividade hipernociceptiva da interleucina-18 (IL-18), nos modelos de pressão constante e crescente na pata de ratos e esta atividade não apresenta participação significativa de prostaglandinas, amins simpatomiméticas ou leucotrienos, mas a participação de endotelinas via receptores do subtipo ET_B. Neste contexto, tem sido demonstrada a participação fundamental da ET-1 na ativação dos nociceptores em patologias inflamatórias, através da

ativação de receptores ET_A e/ou ET_B (FERREIRA et al., 1989; RAFFA et al., 1996; PIOVEZAN et al., 1997; WILSON et al., 2001; VERRI JR et al., 2004).

Em relação à bradicinina (BK), uma cinina de origem plasmática, há evidências claras da sua atividade hiperalgésica em vários modelos de hiperalgésia inflamatória. Embora tenha sido demonstrado que a BK pode ativar diretamente os nociceptores, causando dor manifesta (ARMSTRONG et al., 1957; SICUTERI et al., 1965; FERREIRA et al., 1972; WHALLEY et al., 1987) foi verificado que podem também desenvolver hiperalgésia inflamatória através da sensibilização dos nociceptores (FERREIRA et al., 1972; FERREIRA et al., 1978a, 1978b). A BK pode sensibilizar as fibras através de sinergismo com outros mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas, serotonina, citocinas ou pela liberação de histamina a partir de mastócitos (NICOL e CUI, 1994).

Estudos descreveram que estímulos lesivos provocam respostas precoces consideradas reações de alarme nas quais células residentes, como macrófagos e mastócitos, desempenham papel crucial. Essas células sinalizam para outras células a existência de lesão tissular, via liberação de citocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (IL)s. Neste contexto, as citocinas parecem constituir uma ligação entre lesão celular ou o reconhecimento dos agentes estranhos e a liberação de mediadores inflamatórios responsáveis pelo desenvolvimento de sinais e sintomas locais ou sistêmicos (FERREIRA, 1980).

Neste sentido, Ferreira e colaboradores (1988) demonstraram que a IL-1 β é capaz de induzir hipernocicepção mecânica plantar em ratos quando administrada intraplantarmente. A resposta hipernociceptiva induzida pela IL-1 β foi prevenida pelo pré-tratamento com indometacina (antiinflamatório não esteroide), sugerindo que a IL-1 β ativa o componente prostaglandínico da hipernocicepção inflamatória.

Posteriormente, Cunha e colaboradores (1991) demonstraram que a quimiocina IL-8 induz resposta hipernociceptiva plantar em ratos. E esta resposta não é alterada pelo pré-tratamento com antiinflamatórios não esteróides ou por soro anti-IL-1. No entanto, a resposta hipernociceptiva induzida pela IL-8 foi inibida pelo tratamento com guanetidina (depletor de aminas endógenas), antagonistas beta adrenérgicos ou antagonistas dopaminérgicos do tipo DA-1. Esses resultados sugerem que a resposta hipernociceptiva induzida pela IL-8 é dependente da ativação do componente simpático e independente da liberação de prostaglandinas.

Dando continuidade aos estudos, Cunha e colaboradores (1992) demonstraram que a IL-6 é capaz de induzir resposta hipernociceptiva mecânica plantar em ratos. Essa resposta hipernociceptiva foi abolida pelo pré-tratamento com soro anti-IL-1 ou indometacina, sugerindo a participação da IL-1 e ativação da síntese de prostaglandinas na resposta hipernociceptiva induzida pela IL-6. De maneira complementar, Cunha e colaboradores (1992) demonstraram que a citocina TNF- α é capaz de induzir hipernocicepção mecânica e térmica. A liberação de TNF- α antecede a liberação de IL-1, IL-6 e IL-8. Além disso, foi demonstrado que IL-1 β e IL-6 ativam o componente de síntese de prostaglandinas. Enquanto, IL-8, GRO α , RANTES (“regulated on activation, normal T expressed and secreted”) e CINC-1 ativam o componente simpático.

Ainda em relação a gênese da hipernocicepção inflamatória, foi demonstrado que a administração de CINC-1 na superfície plantar de ratos foi capaz de induzir hipernocicepção mecânica plantar que foi inibida pelo pré-tratamento com atenolol ou com guanetidina. Esses resultados sugerem que a CINC-1 induz hipernocicepção por ativar o componente simpático (LORENZETTI et al., 2002).

Em modelos animais, de hiperalgisia mecânica, as respostas à carragenina (Cg) e ao lipopolissacarídeo (LPS), foram desencadeadas pela ligação da BK em receptores do tipo B1 e B2 de bradicinina, os quais estimulam a liberação de fator de necrose tumoral-alfa (TNF α). Por sua vez, o TNF α induz a produção de IL-1 β e IL-6, os quais estimulam a produção de produtos da COX, e IL-8, a qual estimula a produção de aminas simpáticas (CUNHA et al., 1992; FERREIRA et al., 1993, POOLE et al., 1999). Este fato demonstra um papel complexo da BK na hiperalgisia mecânica.

Portanto, nos últimos 15 anos, nosso grupo tem trabalhado com o conceito de que a liberação dos mediadores finais da hipernocicepção cutânea é precedida pela liberação de citocinas por células residentes ou migratórias. Utilizando modelos de hiperalgisia cutânea mecânica em ratos, foi demonstrado que a administração de Cg ou LPS induz a produção de bradicinina, que estimula a liberação do TNF- α . Este último induz a produção de IL-6 e IL-1 β , que estimulam a formação de produtos da COX, principalmente a produção de PGE₂. O próprio TNF- α também é capaz de induzir a liberação de quimiocinas (IL-8 – humanos, CINC-1 – ratos e KC - camundongos) que estimulam a liberação/produção de aminas simpáticas (CUNHA

et al., 1992, FERREIRA et al., 1988; FERREIRA et al., 1993; LORENZETTI et al., 2002).

Baseando-se nos resultados obtidos em ratos, Cunha et al., (2005), demonstraram também a existência de liberação seqüencial de TNF- α , IL-1 β e quimiocina derivada de queratinócitos (KC) em modelo de hipernocicepção mecânica induzida por Cg em camundongos. Foi observado que o efeito hipernociceptivo da Cg estava parcialmente inibido nos animais geneticamente modificados para o receptor p55 (TNFR1 $^{-/-}$). Adicionalmente, este efeito hipernociceptivo foi reduzido parcialmente pelo pré-tratamento com anticorpo anti-KC (AbKC) ou IL-1ra. Estes resultados sugerem que a injeção intra-plantar de Cg induz a liberação de TNF- α , o qual age em receptores TNF-R1 $^{-/-}$, KC e IL-1 β . Dando continuidade ao estudo, os resultados demonstraram que a resposta hipernociceptiva induzida pelo TNF- α estava ausente nos animais TNFR1 $^{-/-}$ e nos animais selvagens foi parcialmente inibida pelo pré-tratamento com IL-1ra, mas não pelo pré-tratamento com AbKC. Além disso, a hipernocicepção induzida pelo TNF- α foi parcialmente inibida pelo pré-tratamento com indometacina, mas não pelo pré-tratamento com guanetidina. Os autores também demonstraram que o KC induziu resposta hipernociceptiva que não foi alterada nos animais TNFR1 $^{-/-}$, mas foi parcialmente inibida pelo pré-tratamento com IL-1ra. O efeito hipernociceptivo induzido pela quimiocina KC foi parcialmente inibido pelo pré-tratamento com indometacina ou guanetidina, e foi mais efetivo com a co-administração de indometacina e guanetidina.

Os resultados sugerem que a quimiocina KC induz uma resposta hipernociceptiva que é dependente de prostaglandinas, aminas simpáticas e IL-1 β , mas não TNF- α . Prosseguindo o estudo, os autores também demonstraram que a hipernocicepção induzida pela IL-1 β foi inibida pelo pré-tratamento com IL-1ra e indometacina. Sendo que esta resposta hipernociceptiva não foi alterada pelo pré-tratamento com AbKC, guanetidina ou nos animais TNFR1 $^{-/-}$. Os resultados sugerem que em camundongos a IL-1 β causa hipernocicepção via produção de prostaglandinas. Estes resultados confirmaram que, em camundongos, a liberação de mediadores primários responsáveis pela hipernocicepção cutânea é precedida pela cascata de citocinas. Estas citocinas atuam em seqüência distinta, porém o

efeito final é indireto e mediado pela liberação de prostanóides e aminas simpáticas (CUNHA et al., 2005).

1.2 Recrutamento Leucocitário

A partir da década de 80, estudos conduziram a observações que sugeriram a existência de relativa dependência entre os fenômenos, observados na inflamação, edema, dor inflamatória e migração leucocitária. Dados da literatura demonstraram que os leucócitos têm participação central no aumento de permeabilidade e formação de exsudato (WEDMORE e WILLIAMS, 1981; ISSEKUTS, 1984; ISSEKUTS e MOVAT, 1982), bem como no desencadeamento da hiperalgesia inflamatória induzida por mediadores inflamatórios como o LTB₄ (LEVINE et al., 1984; BISGAARD e KRISTENSEN, 1985).

A migração leucocitária para o local da lesão celular é uma das etapas essenciais da defesa do organismo contra um agente agressor. Nos estágios iniciais da maioria dos processos inflamatórios, o leucócito predominante é o neutrófilo, permanecendo em geral 12-24 horas no local da lesão. Após esse período, o neutrófilo inicia um processo de morte programada (apoptose), sendo em seguida fagocitado por macrófagos. A partir da décima hora surgem progressivamente os eosinófilos, macrófagos e linfócitos, que permanecem por cerca de uma semana no local, se o agente agressor for removido. Caso contrário ocorre a cronificação do processo (SAVILL et al., 1989; HASLETT et al., 1994; SAVIL, 1997).

O processo de migração leucocitária tem início com a liberação de mediadores quimiotáticos, que formam um gradiente entre o sítio inflamatório e os vasos sanguíneos. Após a liberação destes mediadores e através de uma seqüência de etapas como rolamento, adesão, transmigração e locomoção, os neutrófilos direcionados pelos mediadores quimiotáticos atingem o local da inflamação. Entre as moléculas envolvidas no 'rolamento' do neutrófilo sobre as células endoteliais, podemos destacar as selectinas (E-, P-selectina) nas células endoteliais e a L-selectina nos neutrófilos. As β_2 -integrinas se ligam às moléculas da superfamília das imunoglobulinas, como o VCAM-1, PECAM-1 E ICAM-1, e medeiam à adesão firme e a transmigração dos neutrófilos (ZIMMERMAN et al., 1992).

Uma vez aderidos, os neutrófilos ultrapassam a barreira endotelial, por aberturas entre as células endoteliais ou através destas (diapedese e migração transendotelial, respectivamente), e se dirigem ao foco da lesão. A liberação de mediadores quimiotáticos forma um gradiente entre o sítio inflamatório e os vasos sangüíneos fundamental para o correto direcionamento dos leucócitos para o foco inflamatório (HARKNESS, 1981).

As citocinas clássicas, como a IL-1 β e TNF- α e vários mediadores inflamatórios, como LTB₄, PAF, histamina, C5a, e várias quimiocinas, como IL-8 e gene relacionado à oncogene (GRO)- α , induzem a migração de neutrófilos por aumentar a expressão de moléculas de adesão nos neutrófilos e nas células endoteliais, assim como induzir a liberação de outros fatores quimioatraentes (BURKE-GAFFNEY e HELLEWELL, 1996; KOMATSU et al., 1997; FRICKE et al., 1985; MANTOVANI, e DEJANA, 1998; MACMILLAN e FOSTER, 1988; BRINDER et al., 1999; SZEKANECZ et al., 2003).

O neutrófilo presente no foco infeccioso é capaz de fagocitar e digerir os microorganismos. Estas células possuem em seus grânulos citoplasmáticos um conjunto de substâncias com atividade enzimática, que participam da digestão dos agentes injuriantes. Entre essas substâncias encontramos, principalmente, lisozimas, mieloperoxidases, elastases, catepsinas e hidrolases ácidas (nos grânulos azurófilos) e lisozimas, colagenases e lactoferrina (nos grânulos específicos) (LEHRER, 1988).

Além dos grânulos, os neutrófilos também possuem um sistema enzimático oxidativo, acoplado à membrana plasmática, conhecido como NADPH oxidase, que é responsável pelo aumento do metabolismo oxidativo. Este é um sistema transportador de elétrons que transfere elétrons do NADPH intracelular para o oxigênio, reduzindo-o a ânion superóxido (O₂⁻), o qual pode ser rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio e, estes, a radicais hidroxilas, denominadas genericamente de intermediários reativos do oxigênio (BELLAVITE, 1988; MALECH e GALLIN, 1987; RUBANYI, 1988; SLATER, 1984).

A artrite reumatóide é uma doença inflamatória crônica que apresenta manifestações locais e sistêmicas, caracterizada por infiltrado inflamatório crônico na membrana sinovial, sendo este considerado o principal responsável pelas lesões

articulares que ocorrem nos quadros agudos da doença (KITSIS e WEISSMANN, 1991). De acordo com Hollingsworth et al., (1967), os neutrófilos constituem cerca de 90% das células encontradas no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide. Nesta patologia além da migração celular, ocorre intensa dor articular e até mesmo remodelagem tecidual, associada à destruição da cartilagem. Portanto, tais evidências corroboram com a hipótese da existência de relação entre nocicepção articular e migração leucocitária articular.

1.3 Artrite e o modelo de inflamação articular tíbio-tarsal

A artrite é uma doença inflamatória crônica que apresenta manifestações locais e sistêmicas e abrange cerca de 1% da população ocidental (MEINECKE et al., 2005). Caracteriza-se pela proliferação persistente de células sinoviais e intensa resposta inflamatória nas articulações, com destruição da cartilagem e osso, edema, dor e impossibilidade ou dificuldade de executar atividades habituais.

Estudos têm demonstrado que a destruição progressiva das articulações afetadas é característica importante nesta patologia (MEINECKE et al., 2005). Além disso, o infiltrado celular tem sido associado aos principais danos teciduais observados durante a artrite reumatóide. Análises morfológicas têm revelado que PMNs do fluido sinovial exibem evidências de ativação e degranulação, provavelmente como resultado da associação com imuno-complexos, fragmentos de cartilagem, citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-18, TNF- α) e quimiocinas (IL-8, IP-10). O acúmulo de produtos potencialmente lesivos no fluido sinovial ocorre devido aos processos de ativação, fagocitose e morte celular de neutrófilos *in situ* (MITANI et al., 2001).

Entretanto, entre os sintomas desta patologia, a dor apresenta-se como o mais intenso e socialmente debilitante. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a dor articular é considerada como o terceiro tipo de dor que mais frequentemente é responsável pela procura do paciente ao médico (GUREGE et al., 1998). Deste modo, a dor nesta patologia é o sintoma mais preocupante, pois este reduz muito a qualidade de vida do paciente. Portanto, torna-se de extrema importância o estudo dos mecanismos responsáveis pela geração deste sintoma.

A dor artrítica está associada ao processo de inflamação da membrana sinovial (sinovite), desencadeado pela infiltração de leucócitos na sinóvia, uma vez que foi demonstrada que as células migratórias são responsáveis pela produção de mediadores pró-nociceptivos, como eicosanóides, cininas, taquicininas, citocinas, quimiocinas e proteases os quais, em associação, produzem lesão tecidual e agem nas fibras nociceptivas primárias causando hiperalgesia (em humanos) e hipernocicepção (em animais) (para revisão ver FIRESTEIN, 2003; GARNERO, DELMAS, 2003).

A dor articular pode ocorrer enquanto a articulação é mantida imóvel, mas, caracteristicamente, é induzida ou agravada durante movimentos ou com a estimulação mecânica da articulação afetada, como quando recebe uma sobrecarga de peso (KELLGREN, 1939; MC EWEN, 1943; D' CRUZ e HUGHES, 1993). No caso da artrite, a hiperalgesia ocorre mesmo quando a articulação é submetida a esforço normal ou à suave pressão (SCHAIBLE e GRUBB, 1993).

Durante a inflamação articular, numerosos neurônios aferentes primários presentes na articulação são sensibilizados. Além disso, a inflamação articular causa sensibilização periférica e central (SCHAIBLE et al., 2002). Corroborando estas observações Rocha et al., (1999), demonstraram que a artrite induzida por zimosan desenvolve distúrbios no movimento, que são independentes do aumento da permeabilidade vascular e do influxo de células, mas são devidos à sensibilização de nociceptores peri-articulares.

Várias hipóteses acerca da origem e modulação da dor articular têm sido propostas. Especial atenção vem sendo despendida em achados sobre uma classe de receptores presentes no tecido articular e também no visceral. Estes receptores são chamados de nociceptores silenciosos, pois como apresentam limiar muito elevado, não são excitados por estímulos nocivos agudos (MCMAHON & KOLTZEMBERG, 1990). Entretanto, durante o processo inflamatório ocorre liberação de mediadores inflamatórios, os quais são responsáveis pela sensibilização destes nociceptores. Trang e colaboradores (1977) e Brodie e colaboradores (1980) demonstraram que no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide contêm quantidades elevadas de PGE₂, assim como outros produtos relacionados com atividade da COX, PGI₂ e tromboxano A₂ (TxA₂). Desta forma, a

liberação destes mediadores poderiam estar relacionada com a sensibilização destes nociceptores articulares.

Além disso, Tonussi e Ferreira (1999), utilizando o teste de incapacitação em ratos, demonstraram que o TNF- α é também um importante mediador nociceptivo na inflamação articular induzida por Cg. Evidências indicam a participação crucial de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β na patogênese da artrite. Corroborando com estas evidências, TNF- α e IL-1 β induzem a migração de neutrófilos por aumentar a expressão de proteína de adesão nos neutrófilos e nas células endoteliais, assim como induzir a liberação de outros fatores quimiotáticos (BURKE-GAFFNEY e HELLEWELL, 1996; KOMATSU et al., 1997). Portanto, o TNF- α apresenta importante papel na artrite, uma vez que as ações do TNF- α são associadas com migração leucocitária, ativação, destruição articular e também nocicepção (WILLIAMS et al., 1992; MAINI et al., 1993; IDOGAWA et al., 1997; PODOLIN et al., 2002).

Outra citocina de grande importância na patofisiologia da AR é IL-1, apresentando duas formas de agonistas, que são a IL-1 α e IL-1 β e um terceiro membro desta família que é o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1Ra). Henderson e cols (1991) demonstraram que a administração intravenosa de IL-1Ra (antagonista do receptor da IL-1) em coelhos inibe a migração leucocitária para a membrana sinovial e cavidade articular, além de bloquear a perda de proteoglicanos da cartilagem articular causada pela IL-1. Com o intuito de demonstrar o papel regulatório da IL-1Ra na artrite, Horai e cols (2000), utilizando camundongos geneticamente modificados para IL-1Ra, demonstraram que estes desenvolveram espontaneamente artropatia inflamatória crônica. Resultados posteriores mostraram que IL-1 induz TNF- α , o qual é importante para o desenvolvimento de artrite nestes animais (HORAI et al., 2004).

Outra citocina que tem sido demonstrado ter um papel relevante na inflamação articular é a IL-18. Neste sentido Gracie e cols (1999) demonstraram que a IL-18 induz a produção de TNF- α , NO e interferon- γ em células sinoviais isoladas de pacientes com artrite reumatóide. Corroborando com esses dados, um recente estudo utilizando modelo de artrite induzida por colágeno, evidenciou que a IL-18 ativa a produção de TNF- α , o qual induz a síntese de LTB₄, que por sua vez atrai

neutrófilos para o sítio inflamatório, onde estes podem contribuir para a resposta inflamatória aguda e crônica (CANETTI et al., 2003). Ademais, a IL-18 induz a expressão de quimiocinas CXC em fibroblastos sinoviais, estimula angiogênese e também está relacionada com o recrutamento de leucócitos devido ao aumento da expressão de moléculas de adesão, através de mecanismos dependentes do fator nuclear κ B (JOOSTEN et al., 2003; LEUNG et al., 2001; PARK et al., 2001; KOMAI-KOMA et al., 2003)

As quimiocinas também apresentam um papel importante na inflamação articular, não apenas por sua atividade quimiotática para leucócitos, mas também por ativar linfócitos e estimular angiogênese (SILVESTRI et al., 2003; WANG et al., 2003). O fluido e tecido sinoviais de pacientes com artrite reumatóide apresentam quimiocinas da família CC, incluindo proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 α) (WANG et al., 2003). A regulação da expressão de receptores para quimiocinas é importante no controle da sinovite reumatóide, uma vez que a migração dos leucócitos está diretamente relacionada com a interação das quimiocinas com seus receptores. Ainda, estudos têm demonstrado o aumento da expressão de receptores para quimiocinas nas articulações reumatóides (RUTH et al., 2001; NANKI et al., 2000). Podolin e cols (2002) utilizando antagonista seletivo dos receptores CXCR2 em dois modelos experimentais de artrite, um induzido por administração de IL-8 ou LPS no joelho de coelhos e outro com administração de ovalbumina (OVA), observou redução tanto na quantidade de neutrófilos, monócitos e linfócitos, quanto nos níveis de TNF- α , IL-8, PGE₂, LTB₄ e LTC₄ no fluido sinovial. Além disso, foi demonstrado inibição da quimiotaxia neutrofílica da IL-8, uma vez que observou-se redução da migração leucocitária para a articulação do joelho. Portanto, pode-se sugerir que a migração leucocitária induzida pela IL-8 parece ser dependente de receptores CXCR2.

Diante do exposto acima, torna-se evidente que estas citocinas e quimiocinas apresentam importância no estabelecimento e desenvolvimento da artrite reumatóide, sendo desta maneira fundamental a investigação do papel destas na nocicepção articular. Assim será possível a compreensão dos mecanismos envolvidos neste sintoma da artrite e assim possibilitar a utilização de fármacos analgésicos que possam contribuir para a melhor qualidade de vida destes pacientes.

Nos últimos anos vários estudos objetivaram o desenvolvimento de modelos experimentais que pudessem ser aplicados no estudo da gênese da dor articular, bem como na investigação de drogas analgésicas e que poderão ser empregadas no tratamento da dor articular.

Neste sentido, Keystone et al., (1977), demonstraram pela primeira vez que a injeção intra-articular de zimosan, o qual é um glicano derivado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, em joelhos de camundongos, é capaz de induzir artrite inflamatória crônica, com infiltrado celular de mononuclear, hipertrofia sinovial e formação de *pannus*.

Assim, a artrite induzida por zimosan, caracteriza-se por rápida indução do processo inflamatório e por achados histológicos semelhantes àqueles observados nesta patologia. Dados da literatura demonstram que, quando injetado na articulação de ratos, camundongos e coelhos, induz inflamação caracterizada por infiltrado de mononucleares em resposta à degranulação de mastócitos, e produção de eicosanóides por PMNs e macrófagos (GEGOUT, et al., 1994). Por várias décadas o zimosan vem sendo utilizado para o estudo dos componentes da resposta imune inata, incluindo a ativação da via alternativa do complemento, estimulação de citocinas inflamatórias, produção de quimiocinas e mecanismos de fagocitose (ADEREM e UNDERHILL, 1999; PILLEMER et al., 1941; DI CARLO et al., 1958).

O uso de zimosan *in vitro* causa ativação da via alternativa do complemento (DOHERTY, et al., 1985), levando à formação de fatores quimiotáticos e anafilatoxinas C3a e C5a, capazes de induzir a liberação de histamina a partir de mastócitos e basófilos (MOTA, 1959; NICLOLSON, et al., 1978); síntese de derivados do AA (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) durante a fagocitose das partículas de zimosan por neutrófilos (CLAESSON, et al., 1981) ou por macrófagos (BONNEY, et al., 1978; HUMES, et al., 1982), e, por último, a formação e liberação de PAF (ROUBIN, et al., 1982).

Colaborando a estes dados, recentemente, nos demonstramos que o zimosan injetado na articulação tibio-tarsal de camundongos induz um processo inflamatório caracterizado por infiltrado de neutrófilos, com participação de prostanóides, LTB₄ e PAF (GUERRERO et al., 2008 e dados não publicados). Neste modelo, a resposta articular hipernociceptiva é dose-tempo-dependente, apresentando pico hipernociceptivo na 7^a hora que se mantêm até a 24^a horas. O

pico hipernociceptivo coincide com o pico de migração leucocitária articular, ou seja, ambos ocorrem na 7ª hora pos injeção intra-articular de zimosan (GUERRERO et al., 2006).

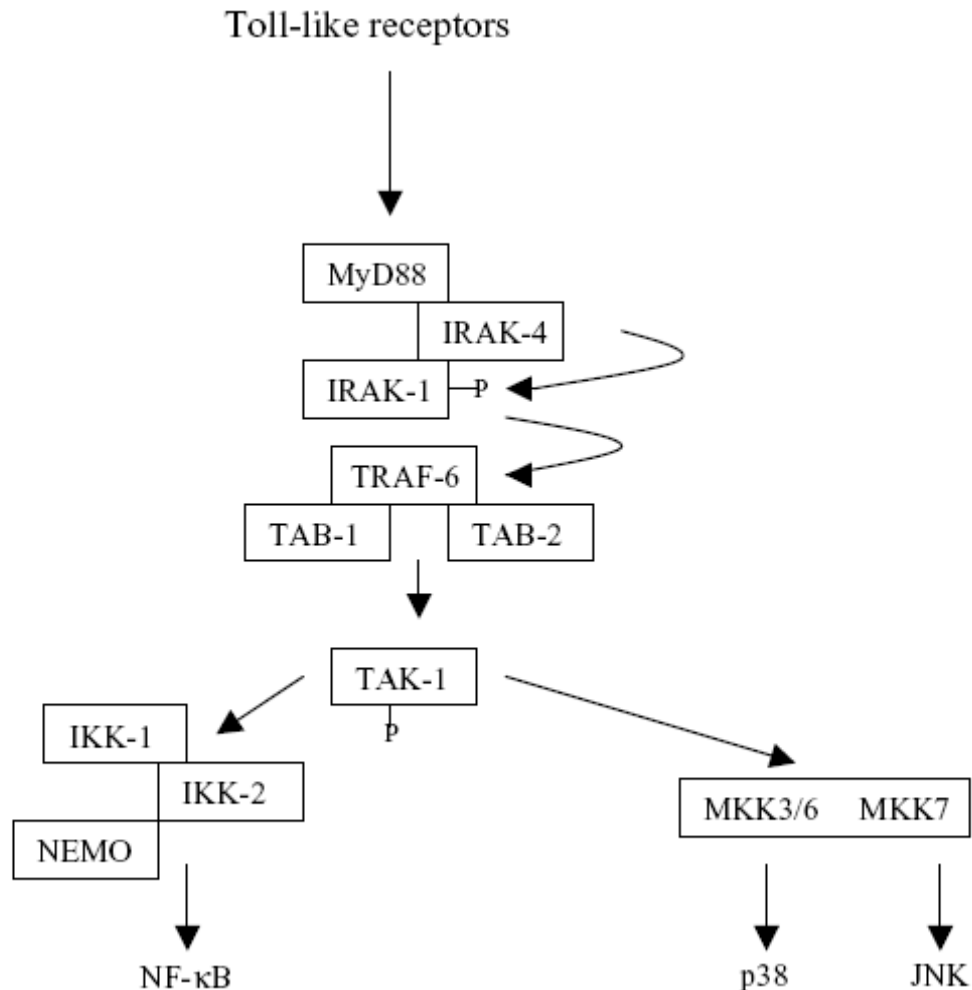
1.4 Receptores Toll-like

Os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) como por exemplo lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas, são potentes ativadores da resposta imune inata, pois ativam uma variedade de tipos celulares como os monócitos e macrófagos de mamíferos levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12, e também induzem a síntese de substâncias inflamatórias como NO e eicosanóides. Essas moléculas efetoras medeiam a resposta inflamatória e o desenvolvimento de células T auxiliares, as quais levam à ativação da imunidade adaptativa (TAKEUCHI et al., 2001).

Os receptores Toll-like (TLRs) permitem que as células do sistema imune respondam a uma variedade de microorganismos. Os TLRs foram primeiramente identificados em *Drosophila* (HASHIMOTO et al., 1988) e atualmente, são conhecidos 10 membros da sua família em humanos e 12 em roedores (TAKEDA et al., 2003). A estimulação dos receptores Toll-like ativa vias de sinalização que culmina com a ativação de fatores de transcrição NF- κ B, proteína quinase p38 e JNK (DUNNE & O'NEILL, 2003). Enquanto TLR-3 e TLR-4 apresentam demonstrações de ativação de outras vias de sinalização que resulta na ativação do fator de transcrição IRF-3, o qual regula a expressão de interferon- β (DOYLE et al., 2002). Estas vias de sinalização envolvem o recrutamento de proteínas adaptadoras. Até o momento foram descritas cinco tipos de proteínas adaptadoras MyD88, MAL/TIRAP, TRIF, TRAM e SARM. Mas no presente trabalho foram estudadas as moléculas MyD88, MAL/TIRAP e TRIF.

A primeira molécula adaptadora descoberta foi MyD88. Evidências sugerem que todos os tipos de receptores Toll-like, com exceção do tipo 3, utilizam a molécula adaptadora MyD88. A ativação se iniciaria com a molécula MyD88 interagindo com IRAK-4, via seus respectivos domínios. A IRAK-4 recruta IRAK-1 para o complexo, conduzindo a fosforilação e ativação. IRAK-1 e IRAK-4 dissociam-se do complexo e interagem com TRAF-6, o qual recruta TAB-1 e TAB-2 para o

complexo. Isso resulta na fosforilação e ativação da quinase TAK-1 que por sua vez ativa quinase p38, JNK e quinase inibitória κ B que culmina com a ativação de NF- κ B (NINOMIYA-TSUJI et al., 1999; AKIRA et al., 2001).

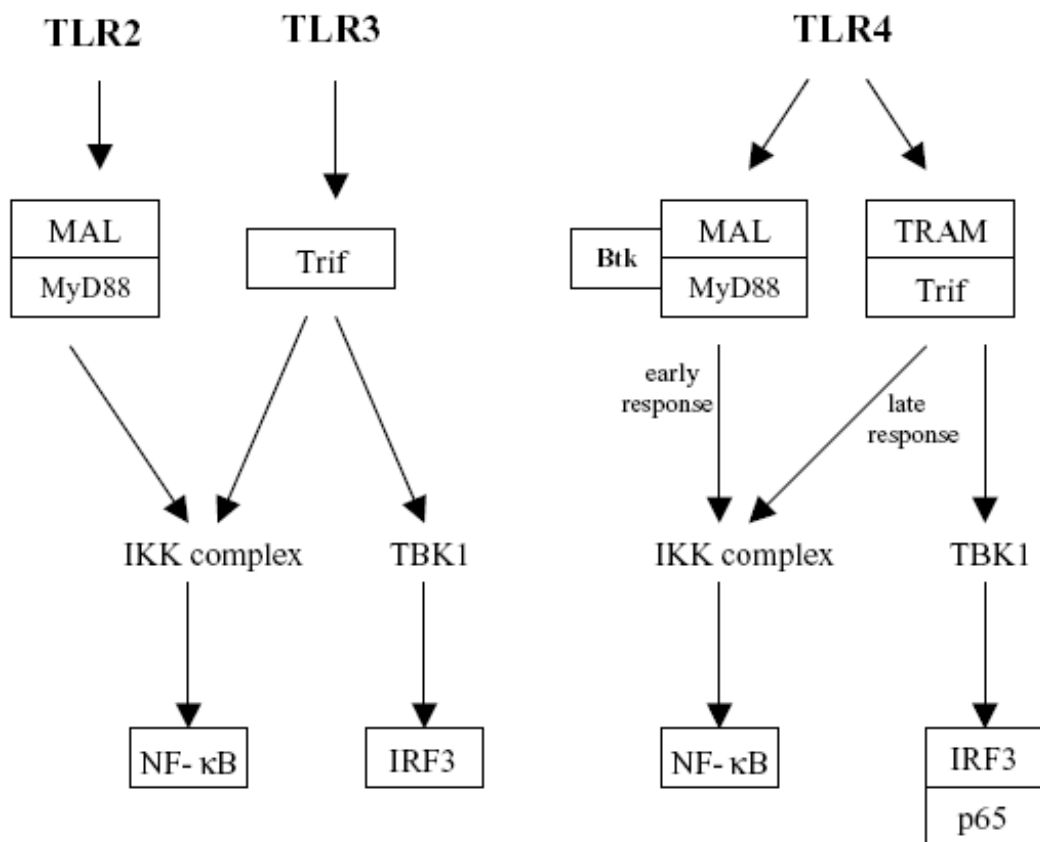


Esquema 1 – Representação esquemática da ativação da via de sinalização dos receptores Toll-like dependente da molécula adaptadora MyD88 . Adaptado de McGETTRICK & O'NEILL, 2004

A próxima proteína adaptadora a ser descrita foi MAL/TIRAP (FITZGERALD et al., 2001). Acreditou-se inicialmente que esta molécula adaptadora estava envolvida com a ativação da via de TLR-4 independente de MyD88. Entretanto, estudos utilizando animais geneticamente modificados para MAL demonstraram que esta molécula estava participando da via de ativação de TLR-2 e TLR-4 dependente de

MyD88 (OSHIUMI et al., 2003). Atualmente sabe-se que estas duas moléculas trabalham em conjunto na ativação dos receptores Toll-like tipo 2 e 4 (YAMAMOTO et al., 2002).

Outra molécula adaptora descrita foi a molécula TRIF. Com o desenvolvimento de animais geneticamente modificados para esta molécula foi possível demonstrar que a ativação de IRF-3 e expressão de interferon- β em resposta à ativação de TLR-3 e 4 ocorria de maneira independente de MyD88 (YAMAMOTO et al., 2003). Em contraste a ativação de NF- κ B por LPS foi praticamente normal em animais deficientes para a molécula TRIF. Entretanto, em animais deficientes para as moléculas MyD88 e TRIF foi completamente abolida. Demonstrando, portanto, uma relevante participação da molécula MyD88 nesta fase inicial de ativação de NF- κ B (Mc GETTRICK and O'NEILL, 2004).



Esquema 2 – Representação esquemática das diferentes moléculas adaptadoras utilizadas pelos receptores Toll-like. Adaptado de McGETTRICK & O'NEILL, 2004

É importante salientar que o TLR-2 é requerido para o reconhecimento de bactérias gram-positivas e fungos, enquanto o TLR-4 está relacionado com o reconhecimento de bactérias gram-negativas (UNDERHILL et al., 1999). Para que ocorra a ativação do TLR-2 é necessário a heterodimerização da molécula do TLR, através de TLR-2 e TLR-6. Estudos sugerem que o heterodímero constituído por TLR-2/TLR-6 medeia a resposta ao zimosan (OZINSKY et al., 2000).

Deste modo, uma variedade de receptores, incluindo os β -glicanos, reconhecem e fagocitam partículas de zimosan (UNDERHILL, 2002), sendo que essa ação parece estar associada com uma lectina tipo C chamada de dectina-1, a qual é expressa em monócitos, macrófagos e células dendríticas (OZINSKY et al., 2000; BROWN, 2002). Recentemente, foi demonstrado que ambos TLR2 e TLR6 ativam o fator nuclear (NF)-KB e a produção de citocinas inflamatórias como, o TNF- α , IL-1 β ou IL-12 por partículas de zimosan, (UNDERHILL et al., 1999; OZINSKY et al., 2000). A atividade pró-nociceptiva dessas citocinas foi demonstrada pelo nosso laboratório (CUNHA et al., 1992; FERREIRA et al., 1991) e outros (SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995). Além disso, diversos grupos têm demonstrado a expressão tanto de receptores TLR-2 quanto de TLR-4 no tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (JOOSTEN et al., 2003; SEIBL et al., 2003; PIERER et al., 2004; KYBURZ et al., 2003). Recentemente, Choe e cols (2003), demonstraram que os receptores TLR-4 são relevantes na patogênese da artrite. Entretanto, parece que estes apresentam papel importante na manutenção, mas não para iniciar os processos inflamatórios crônicos (LEE et al., 2005).

Tendo em vista que os receptores TLRs são potentes ativadores da resposta imune inata e, portanto desencadeiam a produção de citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios que sabidamente participam da hipernocicepção e migração leucocitária observadas em modelos cutâneos, torna-se de grande valia o estudo destes receptores no presente modelo de nocicepção articular.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a hierarquia de liberação de TNF- α , IL-1 β e quimiocina KC na gênese da resposta hipernociceptiva articular induzida por zimosan (agonista Toll-like 2) e LPS (agonista Toll-like 4). Objetiva também avaliar a participação dos receptores Toll-like 2 e 4 e diferenciar as vias de sinalização através das moléculas adaptadoras na resposta hipernociceptiva articular e migração de neutrófilos na cavidade articular.

2.2 Objetivos específicos

- 1) avaliar a participação das citocinas TNF- α , IL-1 β , quimiocina (KC) e receptores Toll-like 2 e 4 e molécula MyD88 na hipernocicepção articular induzida por zimosan (agonista Toll-like 2);
- 2) avaliar se as citocinas TNF- α , IL-1 β , quimiocina (KC) causam resposta hipernociceptiva articular;
- 3) avaliar o perfil de liberação das citocinas TNF- α , IL-1 β , quimiocina (KC) no modelo de hipernocicepção articular;
- 4) avaliar e quantificar a migração leucocitária articular induzida pelas citocinas TNF- α , IL-1 β , quimiocina (KC) administradas intra-articularmente;
- 5) investigar se a inibição da migração leucocitária articular induzida pelas citocinas TNF- α , IL-1 β , quimiocina (KC) administradas intra-articularmente, inibe a hipernocicepção articular;
- 6) avaliar a participação de receptores Toll-like 2 e 4, molécula MyD88, MAL/TIRAP e TRIF na hipernocicepção articular induzida por LPS (agonista Toll-like 4).

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos de acordo com a regulamentação do comitê de ética para a experimentação com animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

3.1 Animais

Nos experimentos foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6 (selvagens), machos de 20 a 25g, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Ribeirão Preto. Também foram utilizados C3/HePaS (selvagem) provenientes do biotério do Departamento de Genética e do Departamento de Imunologia da USP, Campus de Ribeirão Preto.

Além destes, foram utilizados camundongos geneticamente modificados de 20 a 25g, para o receptor p55 do TNF- α (KO p55^{-/-}), MyD88^{-/-} (KO MyD88^{-/-}), TLR-2^{-/-} (KO TLR-2^{-/-}) e deficientes na sinalização via TLR-4, provenientes do biotério do Departamento de Genética e do Departamento de Imunologia da USP, Campus de Ribeirão Preto. Os animais da colônia formadora foram adquiridos do Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, U.S.A). Os animais foram mantidos em fluxo laminar (VECTOR) no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) em caixas de propileno, sob condições controladas de temperatura (23-25° C) e ciclo claro/escuro de 12h, com livre acesso à ração e água, antes de serem submetidos aos ensaios. Também foram utilizados camundongos geneticamente modificados para a molécula MAL/TIRAP e TRIF que foram gentilmente cedidos pelo Prof Doutor Ricardo Gazinelli.

3.2 Avaliação Nociceptiva

A avaliação da hipernocicepção mecânica articular foi realizada pelo método de flexão dorsal da articulação tíbio-tarsal de camundongos descrito primeiramente por Guerrero e colaboradores, (2006). Este se baseia no método eletrônico de quantificação da intensidade da nocicepção inflamatória em camundongo descrito por Cunha e colaboradores, (2004).

Os experimentos foram conduzidos com anestesímetro eletrônico (modelo 1601C, Life Science Instruments California, USA), que capta a pressão através de um transdutor conectado a um contador digital de força expresso em gramas (g). A precisão do aparelho é de 0.1g. O aparelho é calibrado para registrar uma força máxima de 150g, mantendo a precisão de 0.1g até atingir uma força de 80g.

A captação da pressão é feita pelo contato do transdutor de pressão à pata, que é realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno de 4.15mm² de área conectada ao transdutor (Figura 3). Os camundongos foram mantidos individualmente em boxes de acrílico, medindo 12x20x17 cm, cujo assoalho é uma rede de malha de arame não maleável de 1mm de diâmetro. Os animais são depositados no boxe 15 minutos antes do início dos experimentos, para adaptação destes ao ambiente. Os espelhos são posicionados 25 cm abaixo dos boxes de experimentação, para facilitar a visualização da região plantar das patas dos animais (Figura 4).

A avaliação da nocicepção articular consiste na aplicação, por entre as malhas da rede, de uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo, até que o animal seja estimulado a realizar flexão dorsal da articulação tíbio-tarsal, produzindo uma resposta de retirada da pata (Figura 5), para tal foi utilizada ponteira com área de 4,15mm² que permite avaliar a hipernocicepção articular, pois tal ponteira não é *per se* nociceptiva (GUERRERO et al., 2006). A seqüência dos procedimentos experimentais consiste na quantificação da hipernocicepção mecânica articular à 1^a, 3^a, 5^a e 7^a horas após a aplicação do estímulo (Figura 1 e 2). A intensidade de hipernocicepção mecânica articular foi quantificada através de valores absolutos de limiar mecânico (em gramas). Cabe lembrar, que todos os experimentos seguiram as normas e éticas estabelecidas para a experimentação com animais conscientes, recomendadas pela IASP.

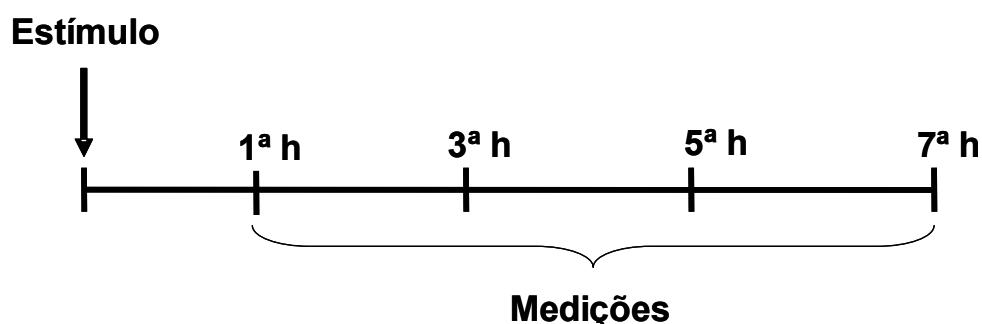


Figura 1 – Representação esquemática do protocolo experimental de avaliação da hipernocicepção mecânica articular com zimosan

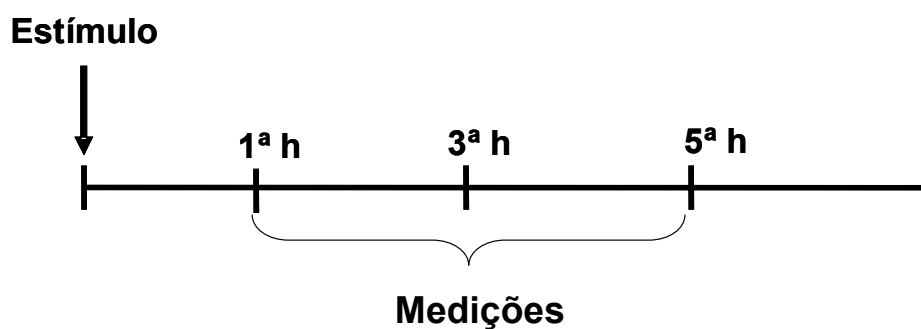


Figura 2 – Representação esquemática do protocolo experimental de avaliação da hipernocicepção mecânica articular com citocinas e LPS



Figura 3 – Foto da ponteira utilizada no modelo de nocicepção articular

A foto apresenta a ponteira utilizada na avaliação da resposta nociceptiva articular. A ponteira A (ponteira de área - $4,15\text{mm}^2$).



Figura 4 – Foto do equipamento utilizado no modelo de nociceção articular

A foto apresenta o anestesímetro eletrônico (Modelo 1601C, Life Science Instruments Califórnia, EUA), as caixas de acrílico, o assoalho em rede de malhas e o espelho, utilizados no modelo de nociceção articular.



Figura 5 – Foto no momento do teste de nociceção articular

A foto apresenta a ponta de maior área (4,15mm²) em contato com a pata do animal. O experimenter aplica, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produza flexão dorsal da articulação estimulada.

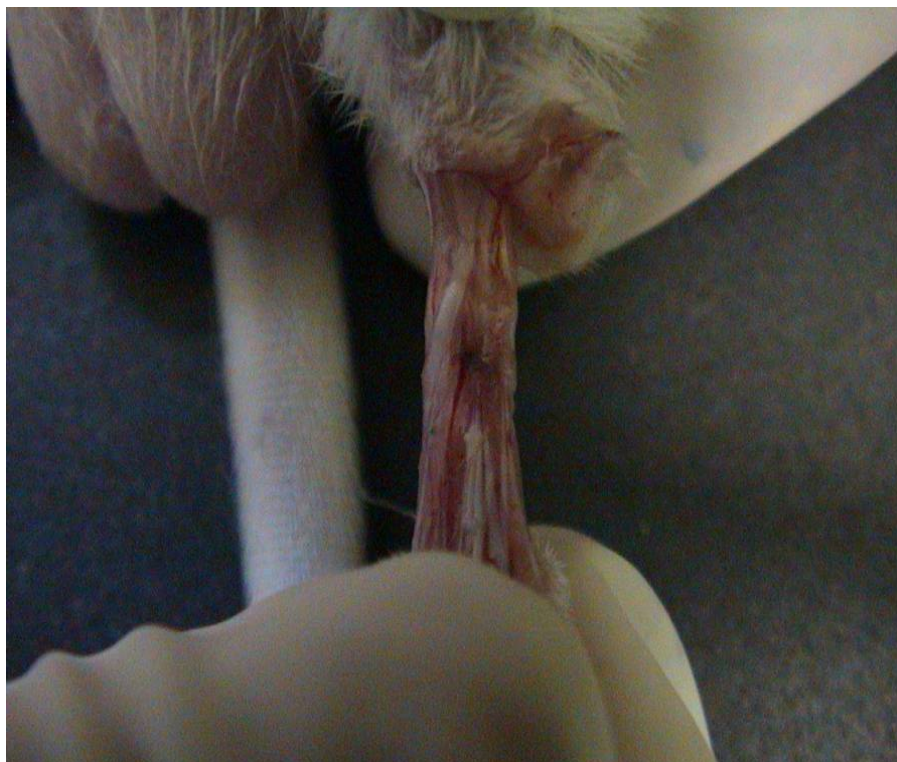


Figura 6 – Foto da injeção intra-articular de azul de Evans

A foto apresenta o local da injeção intra-articular na articulação tíbio-tarsal de camundongos.

3.3 Indução da Inflamação na Articulação Tíbio-Tarsal

O modelo experimental de inflamação induzida por zimosan em joelhos de camundongos foi primeiramente utilizado por Keystone e colaboradores, (1977). No presente modelo artrite foi induzida através da administração de zimosan (Sigma, St Louis, MO, EUA), citocinas, quimiocinas e LPS. Os animais foram previamente anestesiados para posterior realização da injeção intra-articular na articulação direita tíbio-tarsal de camundongos. O volume administrado foi de 5 μ l através de uma seringa hipodérmica (29G), inserida dentro da articulação tíbio-tarsal. Os animais controle receberam injeção única de salina estéril em volume de 5 μ l (GUERRERO et al., 2006).



Figura 7 – Foto da injeção intra-articular

A foto representa o procedimento para a realização da injeção i.art.

3.4 Quantificação da Migração de Neutrófilos para o Tecido Articular

A quantificação da migração de neutrófilos para o tecido articular foi realizada pelo método da mieloperoxidase, segundo o protocolo descrito por Graff e colaboradores, (1994), o qual permite inferir indiretamente o número de leucócitos totais por tecido.

As amostras do tecido articular foram coletadas 7h após o estímulo (para zimosan) e 5h após o estímulo (para citocinas, quimiocinas e LPS) em tampão fosfato de potássio 50 mM, com HTAB (Hexadecil trimetil-amônio-bromide) 13.72 mM, pH 6.0, na concentração de 50 mg de tecido/mL de tampão. As amostras foram homogeneizadas com auxílio do Polytron® (13000 rpm), seguida de centrifugação (2 min, 13200rpm) a 10°C. Então, foi realizada dosagem por reação colorimétrica cinética, na qual em uma placa de 96 poços foi adicionada uma alíquota do sobrenadante da amostra. Posteriormente, adicionou-se 200 µL da solução de reação contendo 52.64 mM de dihidroclorato de O-dianisidina, 0.05% de H₂O₂ 30%, 90 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6.0 e 10 mL de H₂O destilada. Foram realizadas 3 leituras em intervalos de 30 segundos em 450nm (Aparelho Spectra MAX 250®, Molecular Devices), determinando-se assim o número de neutrófilos utilizando-se curva padrão de neutrófilos. As figuras 8 e 9 demonstram a evolução temporal dos procedimentos deste protocolo experimental.

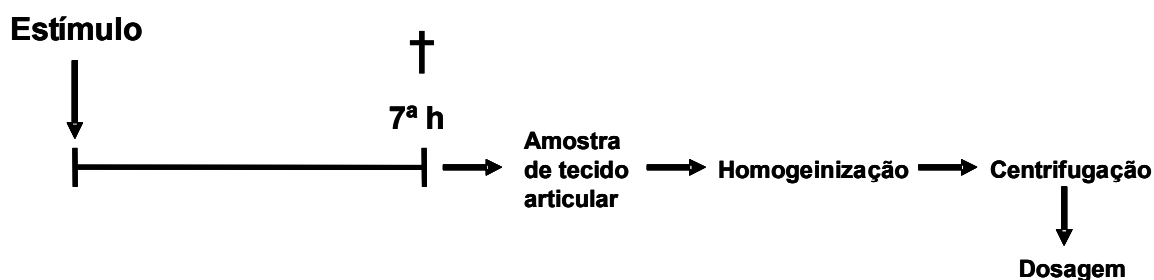


Figura 8 – Representação esquemática do protocolo experimental de quantificação da migração leucocitária para o tecido articular com zimosan.

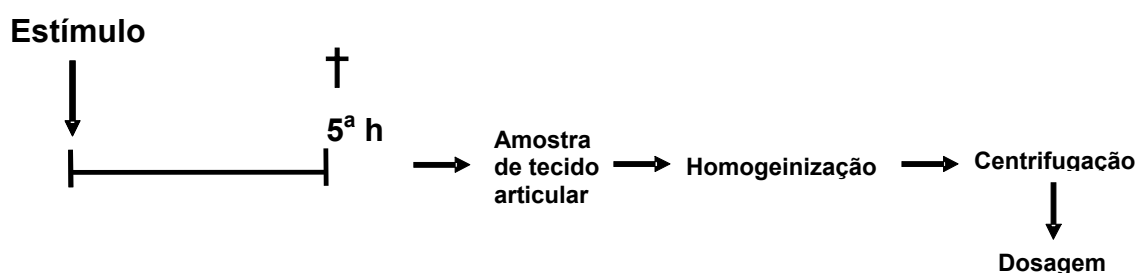


Figura 9 – Representação esquemática do protocolo experimental de quantificação da migração de neutrófilos induzida para o tecido articular por citocinas, quimiocina e LPS.

3.5 Dosagem de Citocinas Envolvidas na Hipernociceção Inflamatória Articular

A metodologia para a dosagem de citocinas em articulações baseia-se em Safieh-Garabedian e colaboradores, (1995). Resumidamente, amostras de articulações, injetadas com estímulo inflamatório, foram obtidas e homogeneizadas em solução tampão fosfato salina (PBS) contendo: 0.4M de NaCl, 0.05% de Tween 20, 0.5% de albumina bovina sérica (BSA), 0.1mM de fenil- metil- sulfonil fluoride, 0.1mM de benzetônio cloride, 10mM de EDTA e 0,001% aprotinina. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (3000RPM/ 10min) e o sobrenadante foi utilizado para avaliar os níveis de TNF- α , IL-1 β e KC por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Brevemente, placas de 96 poços foram incubadas por toda a noite a 4° C com anticorpos contra TNF- α , IL-1 β e KC de camundongos (10 μ g/ml). No dia seguinte, as placas foram lavadas e incubadas por 2 horas com uma solução a 1% de albumina bovina no intuito de evitar ligações inespecíficas. Após esse bloqueio e lavagem das

placas, as curvas-padrão em várias diluições ou as amostras foram adicionadas e incubadas a 4° C por 24 h. As placas foram lavadas três vezes com tampão e os anticorpos policlonais biotinilados contra TNF- α , IL-1 β e KC de camundongos, diluídos 1/ 2.000 foram adicionados (100 μ l/poço). Após uma incubação em temperatura ambiente por 1 hora, as placas foram lavadas e 50 μ l de avidina-HRP diluída 1:5000 foi adicionada. Em seguida (trinta minutos após), 50 μ l do reagente colorido OPD (sol 0,4 mg OPD – 0,4 μ l H₂O₂ – 1ml tampão) foi adicionado e as placas foram mantidas no escuro, em temperatura ambiente, por 15-20 min. A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄ (1 M, 50 μ l poço⁻¹) e as absorbâncias foram determinadas em 490 nm. Os resultados foram obtidos comparando a densidade óptica com as densidades das curvas padrões. Além disso, os resultados foram ajustados para 500 μ l, volume de tampão usado para a extração da citocina da articulação e foram expressos em picogramas da respectiva citocina por articulação. Como controle foram utilizadas os níveis das citocinas determinadas em camundongos normais (sem tratamento- CL) e animais tratados com salina.

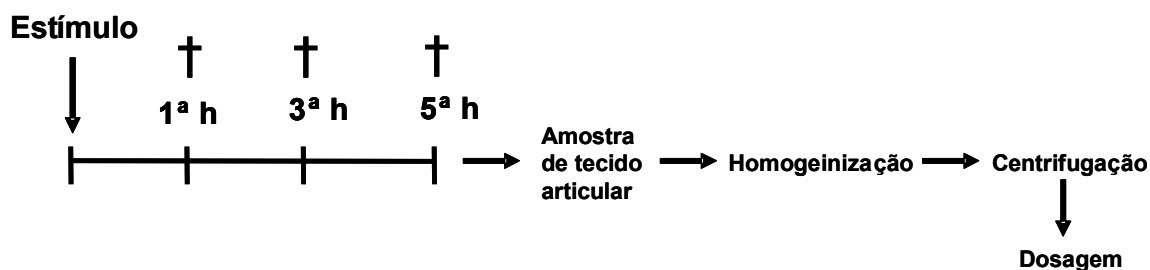


Figura 10 – Representação esquemática do protocolo experimental de dosagem de citocinas no tecido articular.

3.6 Avaliação Farmacológica dos Mediadores Envolvidos nos Efeitos Nociceptivos e Migração de Neutrófilos

Com o intuito de se avaliar a participação das citocinas e quimiocinas, na resposta hipernociceptiva e na migração de neutrófilos induzidas pelo zimosan, citocinas (TNF- α , IL-1 β), quimiocina KC e pelo LPS foram utilizados os seguintes tratamentos farmacológicos: IL-1ra (antagonista solúvel do receptor de IL-1), DF2162 (antagonista de receptor para quimiocinas CXCR1/2), indometacina (inibidor da ciclooxigenase), guanetidina (depletor periférico de aminas simpáticas).

3.7 Protocolos Experimentais

A figura 11, a seguir, descreve esquematicamente os protocolos farmacológicos de pré-tratamentos. E, na seqüência, na tabela 1, são descritos os protocolos dos tratamentos, segundo as drogas, o tempo, a dosagem e a via de administração.

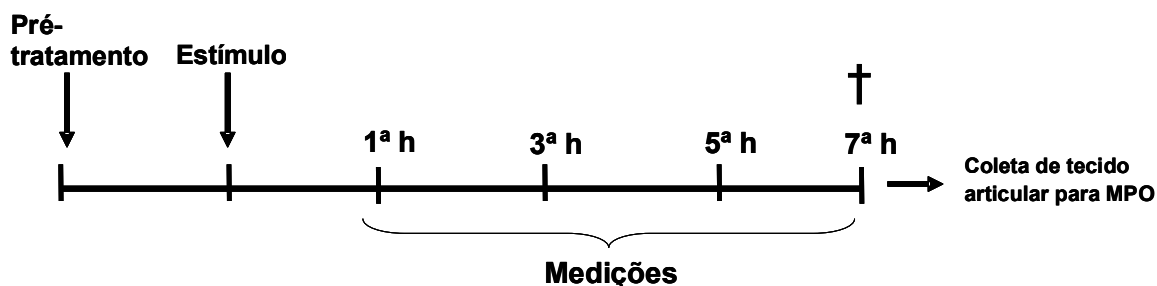


Figura 11 – Representação esquemática dos protocolos farmacológicos.

Tabela 1 – Tratamentos: Segundo as drogas, o tempo, a dosagem e a via

DROGAS	TEMPO	DOSE/VIA
DF2162	60 minutos	15mg/kg/v.o
IL-1ra	15 minutos	30mg/kg/i.v
Indometacina	45 minutos	5mg/kg/i.p.
Guanetidina	30 minutos	30mg/kg/s.c.

3.8 Drogas e Reagentes

Quadro 1 – Drogas e veículo

DROGAS	VEÍCULO
DF2162 (Dompe, L' Áquila, Itália)	Carboximetilcelulose 0.05%
IL-1ra recombinante humana (NIBSC, UK)	Salina 0.9%
Zimosan (Sigma, St Louis, MO, EUA)	Salina 0.9%
IL-1 β recombinante murino (National Institute of Biological Standards and Control, NIBSC, UK)	Salina 0.9%
TNF- α recombinante murino (National Institute of Biological Standards and Control, NIBSC, UK)	Salina 0.9%
KC recombinante murino (Preprotech, México)	Salina 0.9%
LPS	Salina 0.9%

Quadro 2 – Reagentes e veículo

REAGENTES	VEICULO
H ₂ O ₂ 30 % (MERCK, Darmstadt, Alemanha)	NaPO ₄ 0.08M
H – TAB (Sigma, St Louis, MO, EUA)	H ₂ O milliQ
NaCl (MERCK, Darmstadt, Alemanha)	H ₂ O milliQ
NaH ₂ PO ₄ e Na ₂ HPO ₄ (Nuclear, Indústria Brasileira)	H ₂ O milliQ
Na ₂ EDTA (MERCK, Darmstadt, Alemanha)	H ₂ O milliQ
TMB (Sigma, St Louis, MO, EUA)	DMSO
Aprotinina (Sigma, St Louis, MO, EUA)	H ₂ O milliQ
Benzetônio chloride (Sigma, St Louis, MO, EUA)	H ₂ O milliQ
BSA (Sigma, St Louis, MO, EUA)	H ₂ O milliQ
Fenil-metil-sulfonil fluoride (Sigma, St Louis, MO, EUA)	H ₂ O milliQ
OPD (Sigma, St Louis, MO, EUA)	H ₂ O milliQ

3.9 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pelos métodos de variância multivariada (MANOVA) e variância a um critério (ANOVA ONE-WAY) seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni (teste t), de acordo com as variáveis e grupos comparados. O nível de significância foi ajustado em $P < 0,05$. Os resultados foram apresentados na forma de gráficos.

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 A resposta hipernociceptiva articular e a migração leucocitária articular induzidas pelo zimosan em camundongos dependem da atuação dos receptores toll-like 2 (TRL-2) e molécula MyD88

Inicialmente é importante salientar que trabalhos realizados anteriormente por esta autora demonstraram que o zimosan injetado intra-articularmente na articulação tíbio-tarsal em camundongos induz resposta hipernociceptiva articular dose tempo dependentes e que o pico hipernociceptivo articular corresponde ao tempo de 7^o hora pós injeção intraarticular de zimosan. Além disso, é relevante o fato de que o tempo de pico de resposta hipernociceptiva articular coincide com o tempo de pico da migração celular articular. Estes dados sugerem uma possível relação entre a resposta hipernociceptiva articular e a migração celular articular (GUERRERO et al., 2006). Portanto, a concentração de zimosan (30µg/5µL) utilizada nos experimentos seguintes e o tempo de avaliação da resposta hipernociceptiva articular e da migração celular se basearam nos resultados obtidos previamente.

Tendo em vista que os receptores TLRs são potentes ativadores da resposta imune e, portanto desencadeiam a produção de citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios que sabidamente participam da hipernocicepção e migração de neutrófilos observadas em modelos cutâneos, torna-se de grande valia o estudo destes receptores e moléculas adaptadoras no presente modelo de nocicepção articular.

Além disso, diversos grupos têm demonstrado a expressão tanto de receptores TLR-2 quanto de TLR-4 no tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (JOOSTEN et al., 2003; SEIBL et al., 2003; KYBURZ et al., 2003). Portanto, no presente estudo foi avaliada a participação dos receptores TRL-2, TRL-4 e molécula MyD88 na resposta hipernociceptiva articular e migração leucocitária articular induzidas pela administração i.art. de zimosan agonista Toll-like 2 (30µg/5µL/articulação). Para tal, foram utilizados animais deficientes para o receptor TRL-2^(-/-). A avaliação da resposta hipernociceptiva articular foi realizada através do método de flexão dorsal da articulação tíbio-tarsal de camundongos (GUERRERO et al., 2006). Observou-se nestes animais após a injeção intra-articular de zimosan

redução da resposta hipernociceptiva articular em todos os tempos analisados (1-7h). Ao passo que foi evidenciada na 7^o h, tempo este que corresponde ao pico hipernociceptivo articular, redução de 67% da resposta hipernociceptiva articular induzida pela injeção i.art. de zimosan quando comparada aos animais selvagens (C57/BL6) (Figura 13A).

O próximo passo foi avaliar o perfil de migração neutrófilos articular induzida pela administração intra-articular de zimosan nos animais deficientes para o receptor Toll-like 2. Para avaliar este fenômeno inflamatório foi utilizado o ensaio da atividade da mieloperoxidase (BRADLEY et al., 1982). Com este método foi possível observar no tempo de 7^o h pós injeção i. art de zimosan, tempo que corresponde ao pico de migração leucocitária, redução de 87% da migração leucocitária articular nos animais deficientes para o receptor Toll-like 2 quando comparada com os animais controle (Figura 13B).

Também foi avaliada a participação da molécula adaptadora MyD88. Para tal, utilizamos animais deficientes para MyD88 (MyD88^{-/-}) e evidenciou-se uma redução em todos os tempos analisados (1-7h) da resposta hipernociceptiva articular nos animais deficientes para a molécula MyD88. No tempo de 7 horas após a administração intra-articular de zimosan observou-se uma redução de 80% da resposta hipernociceptiva articular nos animais deficientes para a molécula MyD88 quando comparado com os animais selvagens (C57/BL6) (Figura 14A).

Além disso, foi observada no tempo de 7 horas pós administração intra-articular de zimosan inibição de 92% da migração de neutrófilos articular nos animais (MyD88^{-/-}) quando comparada aos animais selvagens (Figura 14B).

Como foi dito anteriormente, os receptores Toll-like, bem como suas moléculas adaptadoras estão envolvidos na produção de mediadores inflamatórios. Portanto, também foi avaliada o nível das citocinas TNF- α e IL-1 β e quimiocina KC na articulação de camundongos deficientes para o receptor Toll-like 2 e para a molécula MYD88 e foi observada redução significativa do nível destas citocinas e quimiocinas tanto nos animais deficientes para o receptor Toll-like 2 quanto para a molécula MyD88 quando comparados com os respectivos animais selvagens (Figura 15 painel A, B e C).

Para se avaliar a participação dos receptores Toll-like 4, utilizamos animais deficientes na via de sinalização para Toll-like 4 (C3/HEJ) e animais controles (C3/HePaS). E observamos que não houve diferença significativa tanto na resposta hipernociceptiva articular quanto na migração leucocitária articular em todos os tempos analisados (Figura 16, painel A e B).

Os receptores Toll-like são receptores transmembrana caracterizados pela presença extracelular de um resíduo rico em leucina e que estão associados ao reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como por exemplo lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas. Estes receptores permitem que as células do sistema imune respondam a uma variedade de microorganismos. Os receptores Toll foram primeiramente identificados em *Drosophila* (HASHIMOTO et al., 1988) e atualmente, são conhecidos 10 membros da sua família em humanos e 12 em roedores (TAKEDA et al., 2003). O receptor toll-like 2 é requerido para o reconhecimento de bactérias gram-positivas e fungos, enquanto o receptor Toll-like 4 está relacionado com o reconhecimento de bactérias gram-negativas (UNDERHILL et al., 1999). Os receptores Toll-like 2 e 4 são constitutivamente expressos em várias células que constituem o sistema imune, incluindo macrófagos, neutrófilos e células dendríticas.

Os receptores Toll apresentam homologia com os receptores da IL-1 e IL-18. Assim, os receptores Toll apresentam um domínio citoplasmático, receptor Toll/IL-1 (IL-1R- família TIR) o qual é necessário para a ativação das vias de sinalização, que culmina com a ativação do fator nuclear NF- κ B (TAKEDA et al., 2003) A transdução do sinal via receptores Toll, assim como IL-1R/IL-18R requer uma molécula adaptadora, conhecida como fator de diferenciação mielóide (MyD88) (MEDZHITOV et al., 1998; KAWAI et al., 1999). A molécula MyD88 apresenta um domínio TIR C-terminal que interage com os receptores Toll ou domínios TIR-IL-1 e um outro resíduo N-terminal que se liga a molécula da família de receptores da interleucina-1 associada a quinases (IRAK). A molécula de MyD88 interage com os resíduos de serina/treonina do receptor de IL-1 associada à quinase-4 (IRAK-4), uma vez formado o complexo MyD88-IRAK-4, a molécula de IRAK-4 recruta e fosforila a molécula de IRAK-1 que se torna ativada. A IRAK-1, se autofosforila e recruta o receptor do fator de necrose tumoral associado ao fator-6 (TRAF-6). A IRAK-1 e TRAF-6 se dissociam do complexo e interagem com moléculas adicionais, que

resulta na ativação do fator nuclear NF- κ B (BURNS et al., 2003; MEDZHITOV, et al., 1998; MUZIO et al., 1997; SUZUKI et al., 2002; WEST et al., 2006).

A importância da molécula MyD88 nos efeitos do LPS induzindo sinalização no receptor Toll-like 4 foi demonstrada utilizando-se animais deficientes para MyD88, pois, foi observado redução na produção por macrófagos e fibroblastos de citocinas pró-inflamatórias (ADACHI et al., 1998; KAWAI et al., 1999). Ademais, células deficientes em MyD88 não respondem a peptidoglicanos, flagelina, CpG DNA ou ssRNA, indicando que Toll-like 2, Toll-like 5, Toll-like 7, Toll-like 8, Toll-like 9 e Toll-like 11 apresentam sinalização via MyD88 (BEUTLER, 2004; TAKEDA, 2003; YAROVINSKY et al., 2005). Portanto, é evidente a importância da molécula MyD88 na resposta aos receptores toll-like, com exceção do receptor Toll-like 3 (KATO et al., 2005). Por estas razões, animais deficientes para a molécula MyD88^(-/-) tem sido utilizados nos estudos da participação dos receptores Toll-like na imunidade inata e adaptativa (FENG et al., 2003). Mas é importante ressaltar que existem outras moléculas adaptadoras na via de sinalização dos receptores Toll-like.

Recentemente foi reportada a expressão funcional de receptores Toll-like 2 em fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite reumatóide (SEIBL et al., 2003; KYBURZ et al., 2003). Ademais, Pierer e colaboradores (2004), evidenciaram a indução de secreção de quimiocinas por ativação de fibroblastos sinoviais via receptores Toll-like 2, o que possivelmente contribui para a formação de infiltrados inflamatórios articulares característicos da artrite reumatóide. Seibl e colaboradores (2003) sugerem que mecanismos dependentes de Toll-like 2 podem contribuir para a ativação de células sinoviais, possivelmente levando a destruição do osso e da cartilagem observadas em quadros de artrite reumatóide.

Ademais, Joosten e colaboradores, utilizando-se de um modelo de inflamação articular induzido por *Streptococcus* demonstraram que esta resposta inflamatória articular é dependente da via de sinalização para receptores Toll-like 2. Para tal, foram utilizados animais deficientes para Toll-like 2 que foram incapazes de desenvolver a inflamação articular, e animais deficientes para MyD88 que também não foram capazes de desenvolverem o processo inflamatório articular. Além disso, os níveis de citocinas e quimiocinas no tecido sinovial de animais deficientes para MyD88 apresentaram-se reduzidas quando comparadas com o controle. Também foi evidenciada uma redução no número de células no tecido articular em animais

deficientes de Toll-like 2 e completa ausência de influxo inflamatório nos animais deficientes para MyD88 (JOOSTEN et al., 2003). Estes resultados corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho. Uma vez que se evidenciou uma redução da resposta hipernociceptiva e da migração de neutrófilos articular tanto nos animais deficientes para Toll-like 2 quanto para a molécula MyD88. Além destes animais também apresentarem redução significativa na produção de citocinas (TNF- α e IL-1 β) e quimiocina KC no tecido articular. Demonstrando portanto, a participação relevante tanto dos receptores Toll-like 2 quanto da molécula MyD88. Ainda, no presente trabalho foi avaliada pela primeira vez a participação do referido receptor Toll-like e da molécula MyD88 em um modelo de inflamação articular avaliando-se o parâmetro hipernociceptivo.

Sabe-se que o principal ligante de Toll-like 4 é o LPS, sendo que o zimosan ativa Toll-like 2, explicando o fato de não ser observada diferença significativa tanto na resposta hipernociceptiva quanto na migração leucocitária articular. Além disso, Lee e colaboradores (2004) sugerem que os receptores Toll-like 4 parecem apresentar importante participação na manutenção, mas não na iniciação dos processos inflamatórios crônicos.

Em conjunto os dados obtidos sugerem a importante participação do receptor Toll-like 2 e da molécula MyD88 na fisiopatologia da artrite, mais especificamente nos fenômenos de hipernocicepção articular e migração de neutrófilos articular, fenômenos estes evidenciados nos quadros de inflamação articular. Portanto, estes resultados sugerem que os receptores Toll-like 2 e a molécula MyD88 são alvos importantes para o tratamento desta patologia.

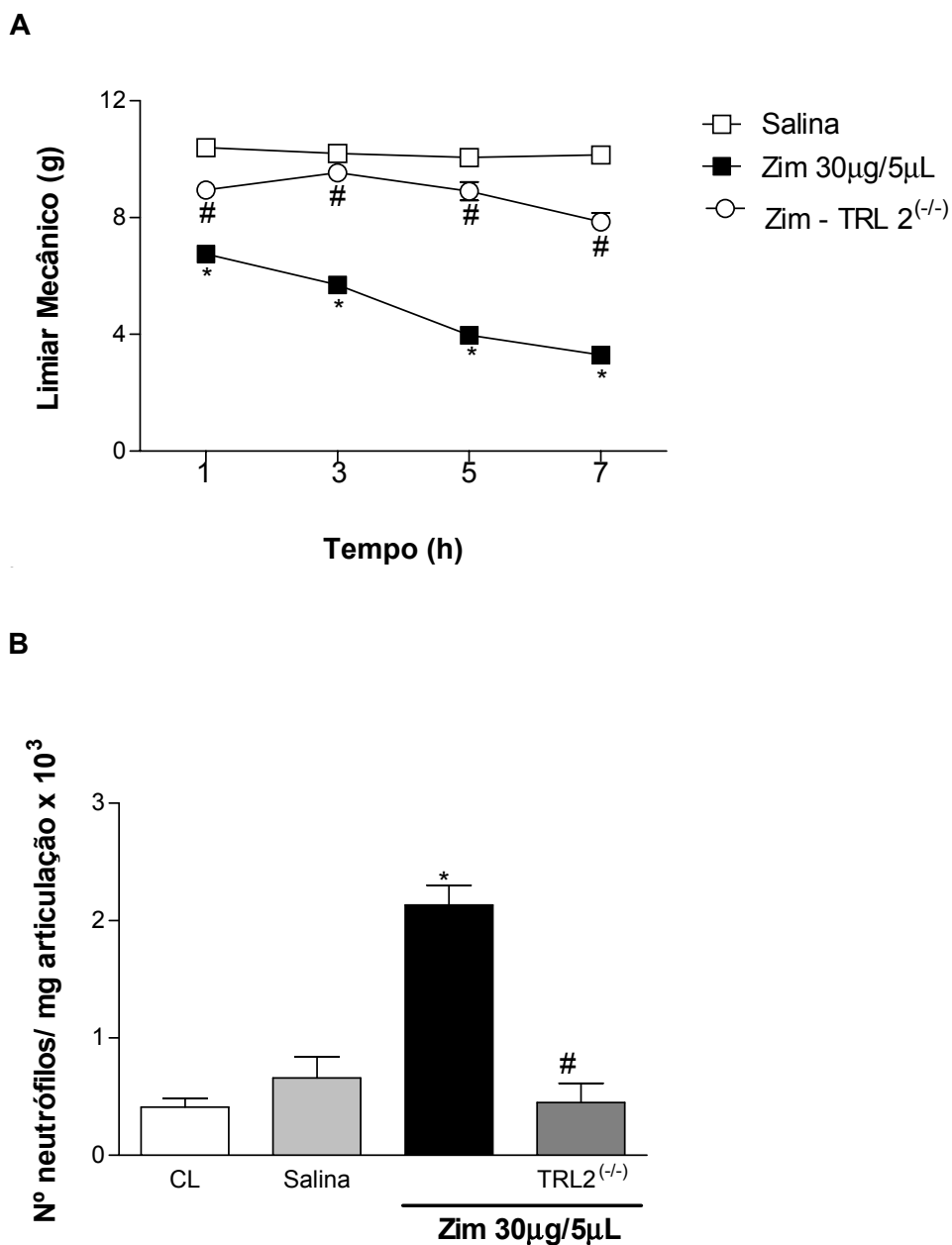


Figura 13 – Participação dos receptores Toll-like-2 sobre a hipernocicepção inflamatória articular e migração de neutrófilos articular induzidas pelo zimosan

Camundongos deficientes para o receptor TRL-2^(-/-) foram utilizados na avaliação da hipernocicepção articular mecânica e migração leucocitária no modelo de inflamação articular induzido por zimosan (30µg/5µL/articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 1-7 hs pelo teste de pressão crescente na pata (painel A) e migração leucocitária para o tecido articular avaliada no tempo de 7 hs pelo ensaio de atividade da mieloperoxidase (painel B). As barras representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # P<0,05 diferença significativa entre zimosan e o grupo TRL-2^(-/-) (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

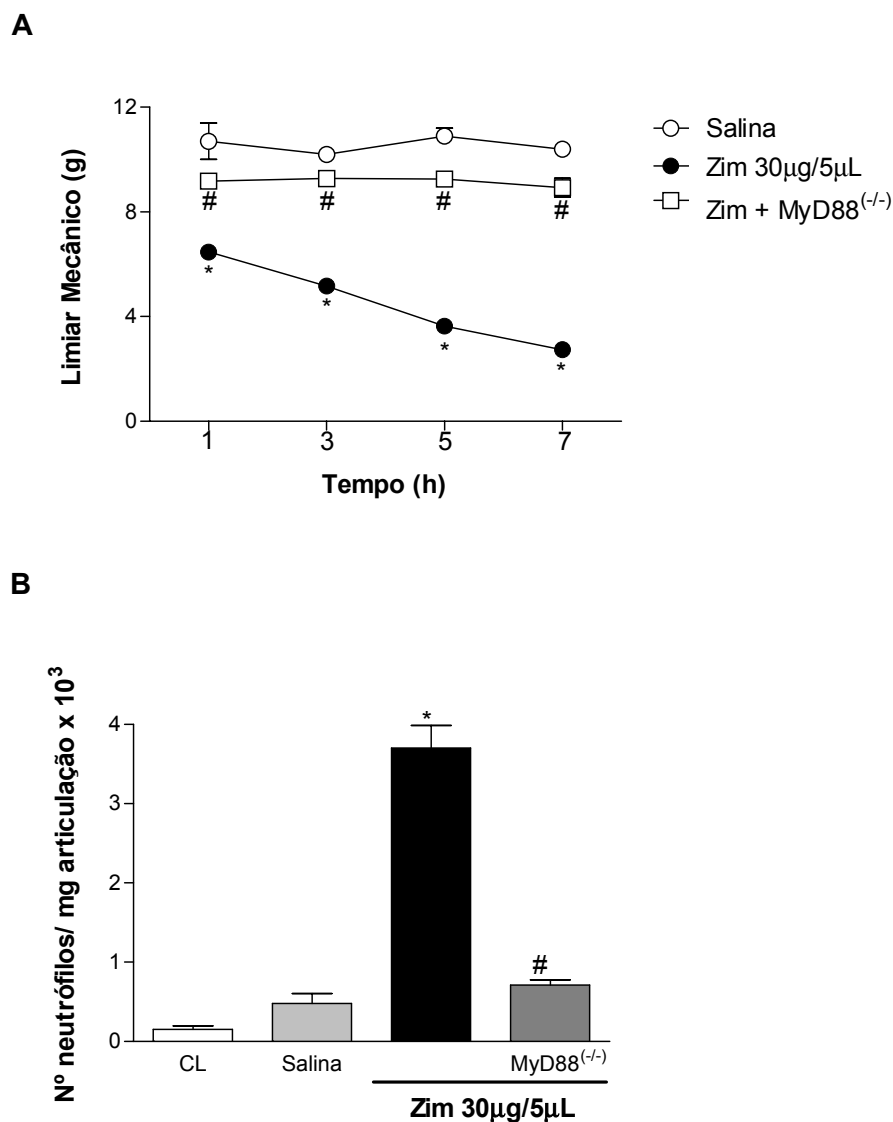


Figura 14 – Participação da molécula MyD88 sobre a hipernociceção inflamatória articular e migração de neutrófilos articular induzidas pelo zimosan em camundongos

Camundongos deficientes para o receptor MyD88^(-/-) foram utilizados na avaliação da hipernociceção articular mecânica e migração leucocitária no modelo de inflamação articular induzido por zimosan (30µg/5µL/articulação). A hipernociceção articular foi avaliada nos tempos de 1-7 hs pelo teste de pressão crescente na pata (painel A) e migração leucocitária para o tecido articular avaliada no tempo de 7 hs pelo ensaio de atividade da mieloperoxidase (painel B). As barras representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # P<0,05 diferença significativa entre zimosan e o grupo MyD88^(-/-) (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

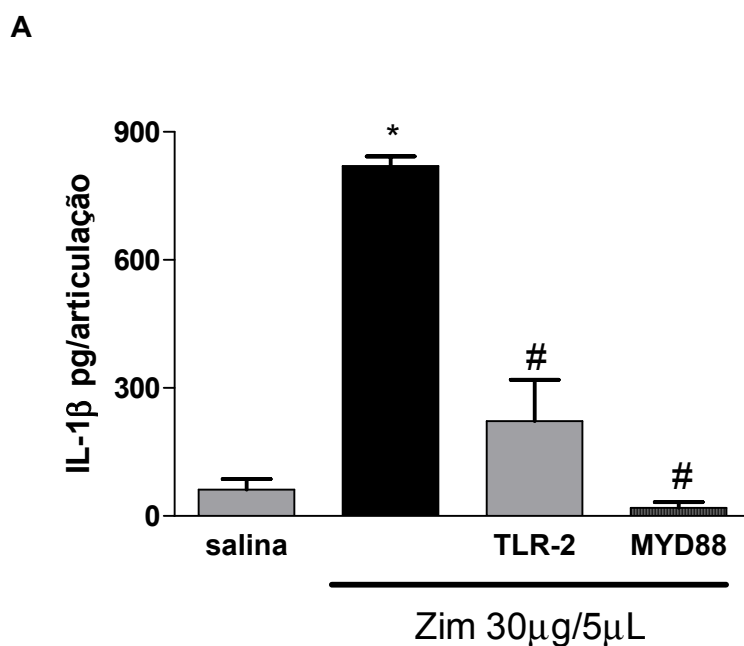


Figura 15A – Efeito da administração i.art. de zimosan sobre a produção de citocina IL-1 β na articulação de camundongos deficientes para o receptor Toll-like 2 e a molécula MyD88

Concentração de IL-1 β nas articulações de camundongos que receberam administração intra-articular de zimosan (30 μ g/5 μ L/articulação) ou salina. No tempo de 5 horas após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulações foram extraídas para dosagem de IL-1 β , a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

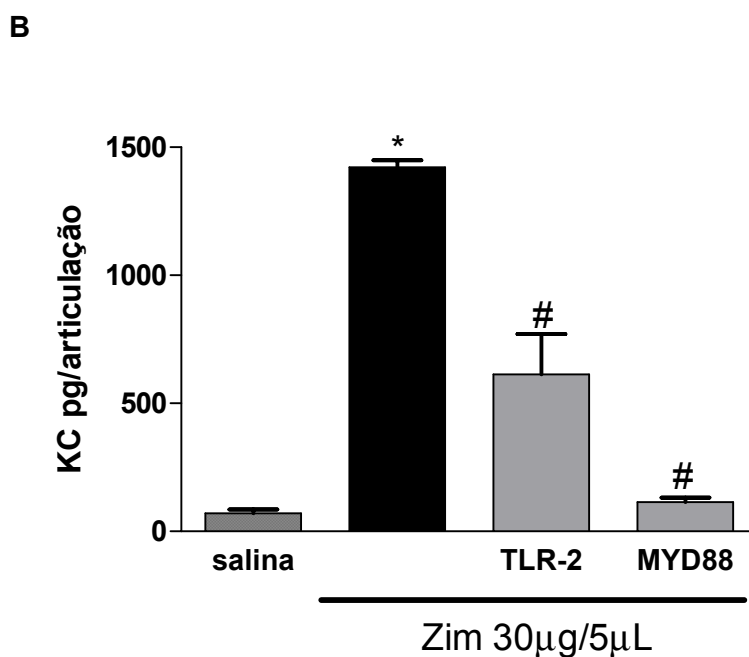


Figura 15B – Efeito da administração i.art. de zimosan sobre a produção de quimiocina KC na articulação de camundongos deficientes para o receptor Toll-like 2 e a molécula MyD88

Concentração de KC nas articulações de camundongos que receberam administração intra-articular de zimosan (30µg/5µL/articulação) ou salina. No tempo de 5 horas após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulações foram extraídas para dosagem de KC, a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

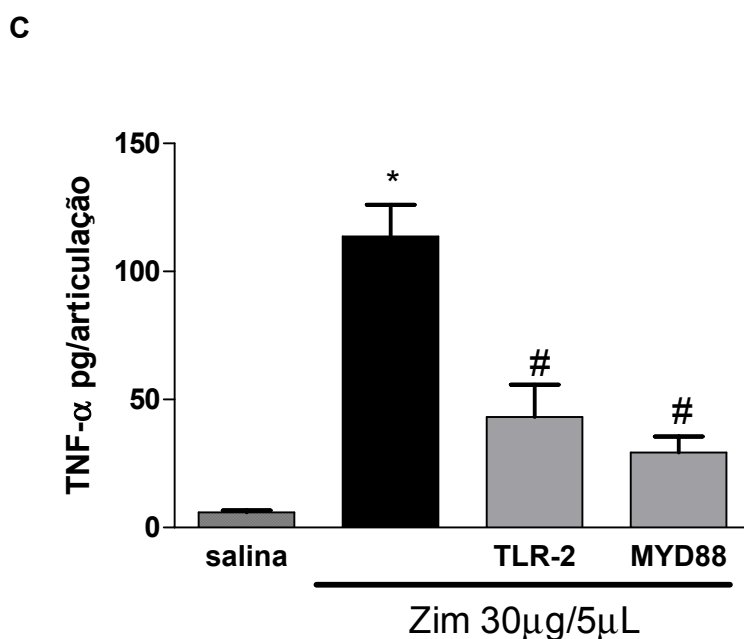


Figura 15C – Efeito da administração i.art. de zimosan sobre a produção de citocina TNF- α na articulação de camundongos deficientes para o receptor Toll-like 2 e a molécula MyD88

Concentração de TNF- α nas articulações de camundongos que receberam administração intra-articular de zimosan (30 μ g/5 μ L/articulação) ou salina. No tempo de 5 horas após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulações foram extraídas para dosagem de TNF- α , a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

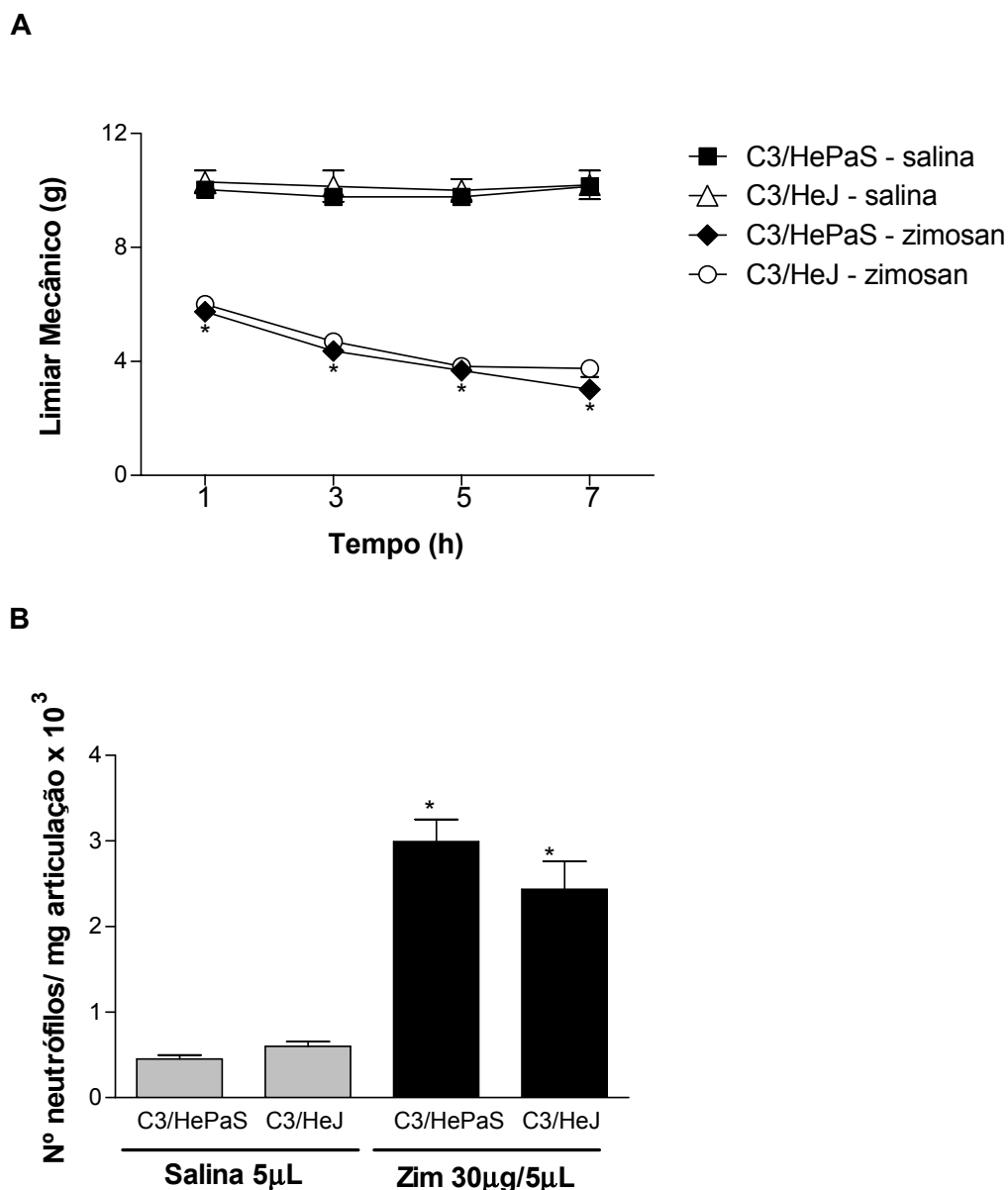


Figura 16 – Os receptores Toll-like 4 não participam da hipernociceção inflamatória articular e migração leucocitária articular induzidas pelo zimosan

Camundongos deficientes para a via de sinalização de TRL-4 (C3/HEJ) foram utilizados na avaliação da hipernociceção articular mecânica e migração leucocitária no modelo de inflamação articular induzido por zimosan (30µg/5µL/articulação). A hipernociceção articular foi avaliada nos tempos de 0-7 hs pelo teste de pressão crescente na pata (painel A) e migração leucocitária para o tecido articular avaliada no tempo de 7 hs pelo ensaio de atividade da mieloperoxidase (painel B). As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo salina (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

4.2 A hipernocicepção e a migração de neutrófilos articular induzidas pelo zimosan são dependentes da ação do TNF- α via receptor TNFR1 (p55) em camundongos

Visto que já está bem demonstrado o envolvimento da citocina TNF- α na dor inflamatória, bem como a sua participação na fisiopatologia das doenças articulares (FELDMANN et al., 1996, TONUSSI & FERREIRA, 1999). Além disso, recentemente foi demonstrado que anticorpos humanos monoclonais anti-TNF- α foram efetivos em suprimir a inflamação, lesões articulares e dor observadas em pacientes com artrite reumatóide (ELLIOT et al., 1994; FURST et al., 2003). Devido a importância do TNF- α em quadros de artrite, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a participação da citocina TNF- α na resposta hipernociceptiva articular e na migração leucocitária articular induzidas pelo zimosan. Neste sentido, foram utilizados camundongos deficientes para o receptor p55 do TNF- α (KO p55^{-/-}), com a finalidade de avaliar a participação do TNF- α neste modelo de inflamação articular.

Existem dois tipos de receptores para TNF, o TNFR1 ou p55 e TNFR2 ou p75 (TARTAGLIA & GOEDEL 1992). Contudo, o receptor p55 tem sido relacionado a processos inflamatórios como a migração de neutrófilos (CANETTI et al., 2001), efeitos deletérios observados no choque endotoxêmico (HEUMANN et al, 1995), dor neuropática em modelo experimental (SOMMER et al., 1998) e recentemente ao processo hipernociceptivo mecânico induzido pela carragenina (Cg) utilizando-se animais deficientes para esse receptor (CUNHA et al., 2005).

Os resultados aqui demonstrados inibição significativa da resposta hipernociceptiva articular no intervalo de 3-7^a h, pós injeção i.art. de zimosan (30 μ g/5 μ L) em animais deficientes para o receptor TNFR1 quando comparado com o respectivo controle selvagem (C57BL/6). Sendo que na 7^a hora pós injeção i.art. de zimosan observou-se 50% de inibição da redução do limiar mecânico articular nos animais deficientes para o receptor TNFR1 quando comparado com o respectivo controle selvagem (C57BL/6) (Figura 17 A). Além disso, foi avaliada a migração de neutrófilos na cavidade articular na 7^a hora pós injeção i.art. de zimosan e observou-se uma redução de 85% da migração neutrofilica articular nos animais deficientes para o receptor TNFR1 quando comparado com o respectivo controle selvagem (C57BL/6) (Figura 17 B). Em conjunto estes dados sugerem, a participação do TNF- α via receptor TNFR1 tanto na resposta hipernociceptiva articular mecânica, quanto

na migração neutrofilica articular neste modelo de inflamação articular induzido pelo zimosan

O envolvimento de TNF- α na hipernocicepção articular induzida por zimosan em camundongos selvagens foi confirmada pela análise das concentrações desta citocina na articulação tíbio-tarsal no intervalo entre 1-5 horas após a injeção de zimosan (30 μ g/5 μ L/articulação). A administração i.art. de zimosan 30 μ g/5 μ L estimulou a produção de TNF- α em camundongos selvagens (Figura 18). Sendo que foi observado um aumento significativo nos níveis de TNF- α nas articulações detectadas 3^a horas após a injeção de zimosan, sendo que se observou um aumento crescente, com níveis significativos na 3^a hora que se manteve na 5^a hora. A concentração de TNF- α foi reduzida após o pré-tratamento com DF2162 e IL-1Ra, sugerindo portanto que KC e IL-1 β estão estimulando a produção de TNF- α neste modelo de inflamação articular (Figura 19).

Dados da literatura descrevem que o TNF- α tem um papel relevante no desenvolvimento da hipernocicepção inflamatória, pois é capaz de estimular a liberação de outros mediadores relacionados à nocicepção, tais como: IL-6; IL-8/CINC-1 e IL-1 β que por sua vez libera os mediadores finais (PGs ou aminas simpáticas) (CUNHA et al., 1992; WATKINS et al., 1995; LORENZETTI et al., 2002). No entanto, esta cascata foi demonstrada em ratos. Recentemente, Cunha e colaboradores (2005) demonstraram que a hipernocicepção mecânica cutânea em camundongos, induzida pela Cg depende também do TNF- α (agindo sobre receptores TNFR1) e da quimiocina, KC. Contudo, em camundongos, ambos atuam através da liberação de IL-1 β , que por sua vez induz a liberação de PGs. Além disso, a KC também induz a liberação de aminas simpatomiméticas. Corroborando a estes dados, Vale e colaboradores (2006) utilizando o modelo de inflamação articular induzida pelo zimosan em joelhos de ratos, demonstraram que o tratamento dos animais com talidomida (inibidor da síntese de TNF- α) reduz de maneira dose-dependente a resposta hipernociceptiva articular. Além disso, foi observada também redução da concentração de TNF- α após o tratamento com a referida droga. Demonstrando a participação do TNF- α na hipernocicepção articular.

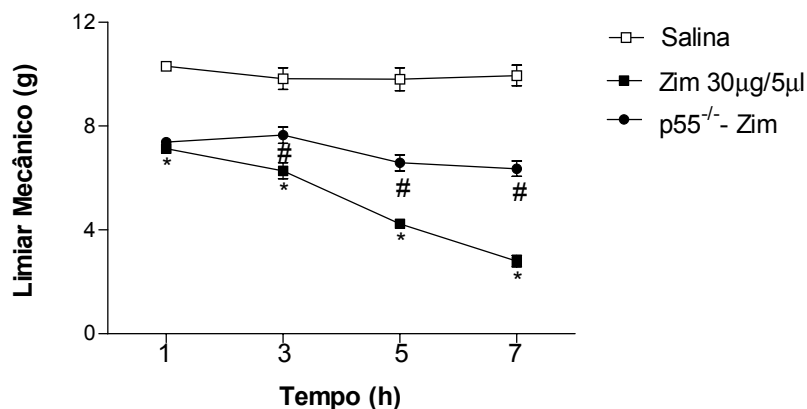
A citocina TNF- α também apresenta ações associadas com o recrutamento de leucócitos, ativação e destruição articular, demonstrando, portanto importante

papel na fisiopatologia da artrite (WILLIAMS, et al., 1992; MAINI et al., 1993; IDOGAWA et al., 1997; PODOLIN et al., 2002). Corroborando a estes dados, Canetti e colaboradores (2003) demonstraram que a migração de neutrófilos observada em camundongos imunizados com ovalbumina (OVA) é também dependente de TNF- α . Além disso, sabe-se que na artrite reumatóide, onde se observa proeminente migração de neutrófilos, os pacientes apresentam concentrações elevadas de TNF- α tanto no fluido sinovial quanto na sinóvia reumatóide (CHU et al., 1991; FELDMANN et al., 1996). De maneira complementar a estes dados, Bombini e colaboradores (2004) utilizando-se de um modelo de artrite asséptica em joelhos de ratos imunizados com OVA, observou intensa migração de neutrófilos na articulação do joelho, sendo que este recrutamento de neutrófilos é dependente de TNF- α . Uma vez que, o acúmulo de neutrófilos foi inibido pelo tratamento com pentoxifilina, talidomida, dexametasona e anticorpo anti-TNF- α . Estes resultados demonstram o importante papel do TNF- α no recrutamento de neutrófilos em processos de inflamação articular.

Recentemente, nosso grupo demonstrou que a citocina IL-33 quando injetada na articulação tíbio-tarsal resulta em resposta hipernociceptiva articular e que esta resposta é mediada pela participação de TNF- α , agindo via receptores TNFR1 (VERRI et al., 2008).

Os dados obtidos no presente trabalho corroboram com os dados da literatura que demonstram um papel relevante do TNF- α na resposta hipernociceptiva articular.

A



B

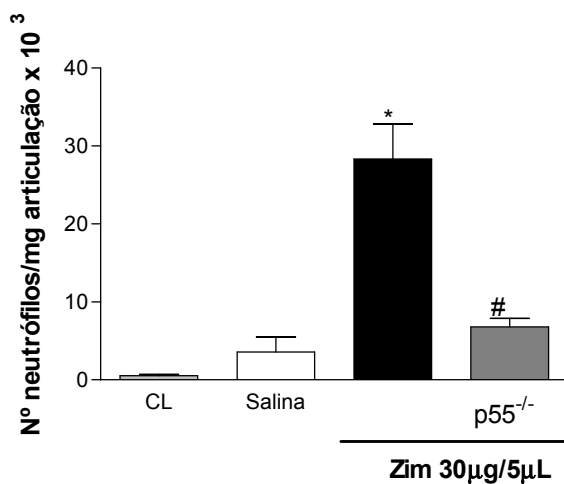


Figura 17 – Participação do TNF- α na resposta hipernociceptiva articular e na migração neutrofílica articular induzidas pelo zimosan em camundongos

Camundongos deficientes para o receptor TNFR1 ($p55^{-/-}$) foram utilizados na avaliação da hipernocicepção articular mecânica e migração leucocitária no modelo de inflamação articular induzido por zimosan ($30\mu\text{g}/5\mu\text{L}$ /articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 0-7hs pelo teste de pressão crescente na pata (painel A) e migração leucocitária para o tecido articular avaliada no tempo de 7hs pelo ensaio de atividade da mieloperoxidase (painel B). As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # $P < 0,05$ diferença significativa entre zimosan e o grupo ($p55^{-/-}$) (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

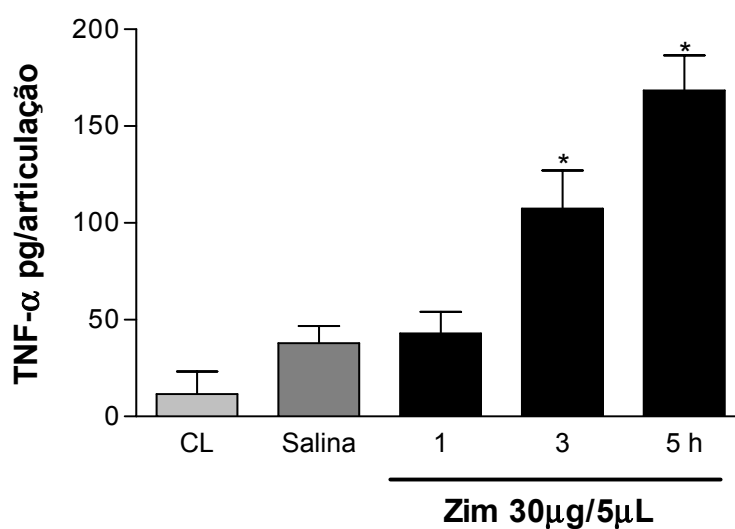


Figura 18 – Curso temporal da produção de TNF- α após injeção de zimosan na articulação de camundongos

Concentração de TNF- α nas articulações de camundongos injetadas com zimosan (30 μ g/5 μ L/articulação), salina ou articulações controle (contra-lateral). Nos seguintes tempos após a injeção (1, 3 e 5 h) os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem de TNF- α , a qual foi determinada por ELISA (painel C). As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

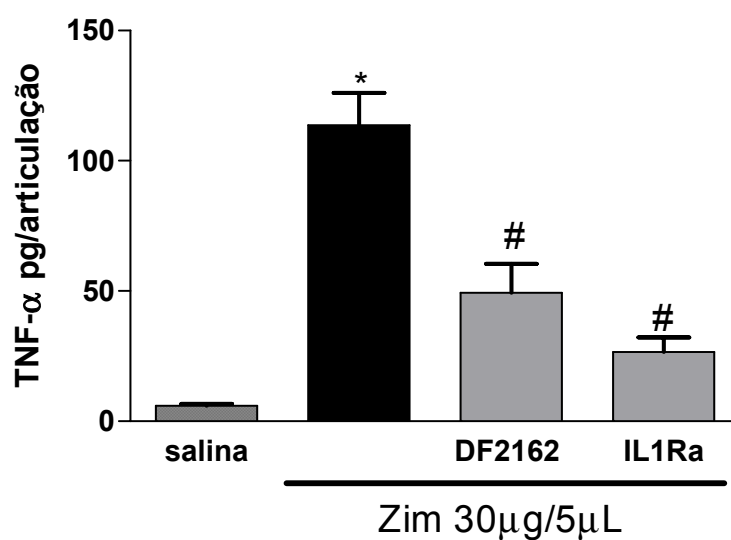


Figura 19 – Efeito do pré-tratamento com DF2162 ou IL-1Ra sobre a produção de TNF- α na articulação de camundongos

Concentração de TNF- α nas articulações de camundongos injetadas com zimosan (30 μ g/5 μ L/articulação) ou salina. No tempo de 5^a horas após a injeção intra-articular de zimosan os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem de TNF- α , a qual foi determinada por ELISA (painel D). As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle. #P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

4.3 A hipernocicepção e a migração neutrofílica articular induzidas pelo zimosan são dependentes da ação de IL-1 β em camundongos.

Para avaliar a participação da IL-1 β na resposta hipernociceptiva e na migração neutrofílica articular induzidas pela administração i.art. de zimosan (30 μ g/5 μ L/articulação) foi utilizado como ferramenta farmacológica o pré-tratamento dos animais com IL-1Ra (antagonista natural do receptor de IL-1) (3, 30 e 100mg/kg)(Figura 20 A) observando-se com as doses de 30 e 100mg/kg promoveu uma considerável inibição da hipernocicepção articular mecânica (56%) na 7^a h pós injeção i. art. de zimosan. Quando foi avaliado o efeito da IL-1Ra sobre a migração neutrofílica a IL-1Ra também promoveu na 7^a h pós injeção i. art. de zimosan, redução na migração neutrofílica articular de 88% quando comparado com o grupo zimosan (Figura 20 B). Portanto, a IL-1Ra causou uma redução tanto na resposta hipernociceptiva articular quanto na migração leucocitária articular neste modelo de inflamação articular induzido pelo zimosan. Sugerindo portanto que a IL-1 β participa destes fenômenos inflamatórios promovidos pelo zimosan quando injetado na articulação.

Para confirmar o envolvimento de IL-1 β na hipernocicepção articular induzida por zimosan em camundongos, a concentração desta citocina foram determinados nas articulações que foram injetadas com zimosan (30 μ g/5 μ L/articulação) e coletadas em tampão para citocinas nos tempos de 1^a, 3^a e 5^a horas pós-injeção. A administração i.art. de zimosan 30 μ g/5 μ L estimulou a produção de IL-1 β em camundongos selvagens (Figura 21). Zimosan produziu um aumento na concentração de IL-1 β nas articulações detectadas 3^a horas após a injeção de zimosan, sendo que apresentou aumentos significativos da liberação entre 3^a e 5^a horas. Além disso, a concentração desta citocina também foi avaliada em animais pré-tratados com DF2162 (antagonista CXCR1/2) e animais deficientes para o receptor p55 do TNF- α e foi observada redução significativa na concentração de IL-1 β tanto nos animais tratados com DF2162 quanto nos animais deficientes para p55, sugerindo portanto, que tanto a quimiocina KC quanto o TNF- α estão induzindo a produção desta citocina (Figura 22).

A família da IL-1 compreende três polipeptídios funcionalmente relacionados e codificados por genes distintos, são eles: IL-1 α , IL-1 β e um terceiro membro desta família que é o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1Ra) (DINARELLO, 1994). Estes agonistas ligam-se com alta especificidade aos dois tipos de receptores IL-1RI e IL-

1RII. A ligação da IL-1 ao receptor IL-1RI inicia a cascata de sinalização intracelular (CASADIO, et al., 2001). Intracelularmente, este complexo recruta a molécula adaptadora MyD88 para o domínio TIR presente na IL-1RI, com subsequente translocação de IRAK1 e 2, recrutamento de TRAF6, que culmina na ativação de NF κ B (BURNS, et al., 2003; CAO, et al., 1996).

Dados da literatura demonstram que pacientes com artrite reumatóide ativa apresentam concentrações plasmáticas elevadas de IL-1 β (EASTGATE et al., 1988). Além disso, a IL-1 β produzida principalmente por macrófagos e monócitos do tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóide tem sido fortemente relacionada às lesões articulares, pois parece mediar a degradação de proteoglicanos (AREND & DAYER, 1995; IVASHKIV, 1996). Neste sentido, Henderson e colaboradores (1991) demonstraram que a administração intravenosa de IL-1Ra (antagonista do receptor da IL-1) em coelhos inibe a migração leucocitária para a membrana sinovial e cavidade articular, além de bloquear a perda de proteoglicanos da cartilagem articular causada pela IL-1, demonstrando assim o papel regulatório da IL-1Ra. A importância da citocina IL-1 na progressão da artrite foi demonstrada utilizando-se de tratamento anti-IL-1, em modelo de artrite induzida por colágeno em camundongos, que demonstrou efetividade em reduzir a destruição articular tanto nos estágios iniciais quanto avançados desta patologia (JOOSTEN, et al., 1996). Além disso, neste mesmo trabalho foi demonstrado diferença de participação do TNF- α em vários estágios da artrite induzida por colágeno, e que o bloqueio deste não elimina a participação da IL-1 (JOOSTEN, et al., 1996).

Além disso, Ferreira e colaboradores (1988) utilizando ratos, demonstraram que a IL-1 β participa da gênese da hipernocicepção inflamatória, via indução da COX, com consequente produção de PGE₂. Ademais, outros pesquisadores também demonstraram a participação da IL-1 β em diferentes modelos de hipernocicepção inflamatória (SCHWEIZER et al., 1988; WATKINS et al., 1994; SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995). De maneira complementar a estes resultados, Cunha e colaboradores (2005) utilizando camundongos pré-tratados com IL-1Ra demonstrou uma inibição parcial da resposta hipernociceptiva mecânica induzida pela Cg. Além disso, já está demonstrado que a IL-1 β também induz a migração de neutrófilos por aumentar a expressão de proteína de adesão nos neutrófilos e nas células endoteliais, assim como induzir a liberação de outros fatores quimiotáticos (FACCIOLLI et al., 1990; BURKE-GAFFNEY e HELLEWELL, 1996; KOMATSU et al., 1997).

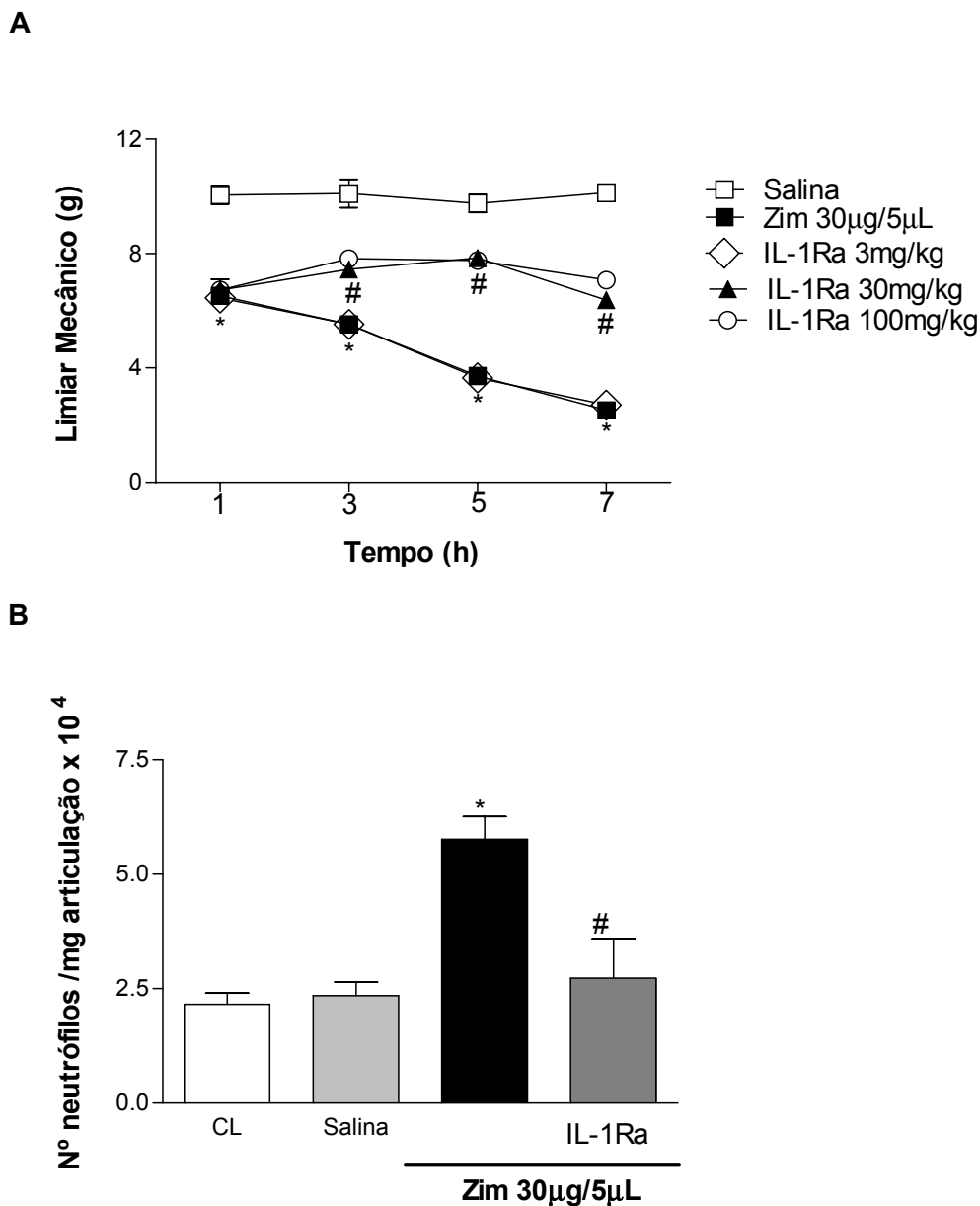


Figura 20 – Participação da IL-1β na resposta hipernociceptiva e na migração neutrofílica articular induzidas pelo zimosan em camundongos

Os animais foram pré-tratados com IL-1Ra (30mg/kg, i.v., 15 minutos) antes da administração de zimosan (30µg/5µL/articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 0-7 hs pelo teste de pressão crescente na pata (painel A) e migração leucocitária para o tecido articular avaliada no tempo de 7 hs pelo ensaio de atividade da mieloperoxidase (painel B). As barras representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # P<0,05 diferença significativa entre zimosan e o grupo tratado(IL-1Ra)(ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

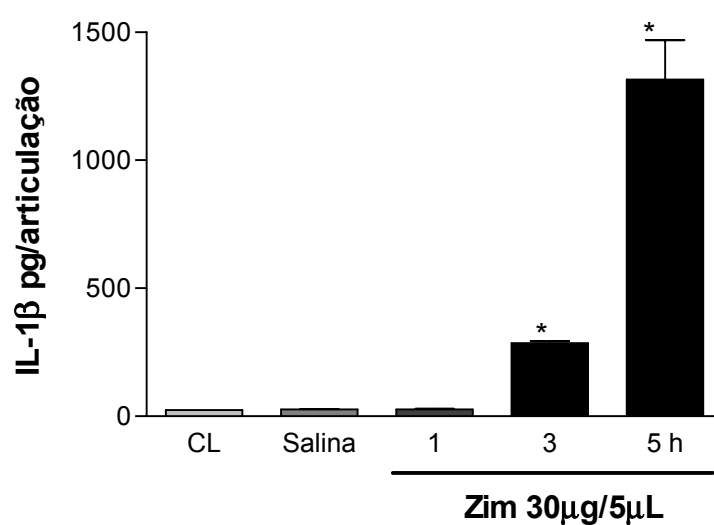


Figura 21 – Curso temporal da produção de IL-1 β após injeção de zimosan na articulação de camundongos

Concentração de IL-1 β nas articulações de camundongos injetadas com zimosan (30 μ g/5 μ L/articulação), salina ou articulações controle (contra-lateral). Nos seguintes tempos após a injeção (1, 3 e 5 h) os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem de IL-1 β , a qual foi determinada por ELISA (painel C). As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

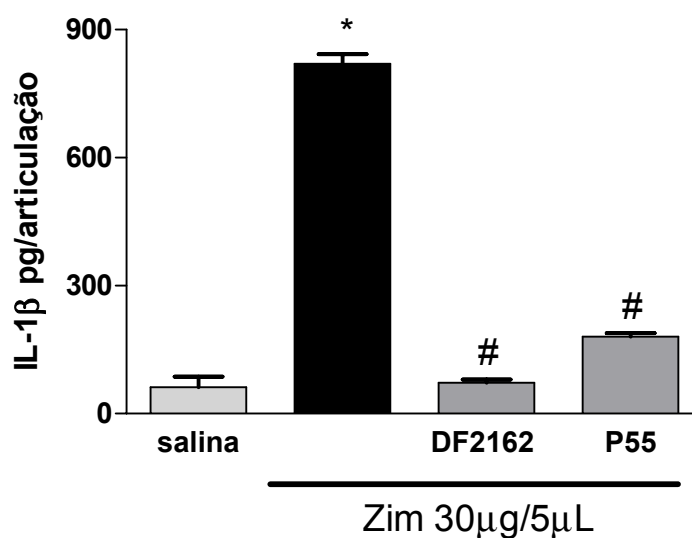


Figura 22 – Efeito do tratamento com DF2162 e animais deficientes para o receptor p55 sobre a produção de IL-1β na articulação de camundongos

Concentração de IL-1β nas articulações de camundongos injetadas com zimosan (30μg/5μL/articulação) ou salina. No tempo de 5 horas após a injeção intra-articular de zimosan, os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem de IL-1β, a qual foi determinada por ELISA (painel C). As barras representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle. #P<0,05 indica diferença significativa comparada com o grupo zimosan.

4.4 A resposta hipernociceptiva e a migração neutrofílica articular induzidas pelo zimosan em camundongos dependem da quimiocina KC

As quimiocinas formam uma grande família de citocinas estruturalmente homologas que estimulam o movimento dos leucócitos e regulam a migração destes para o sangue e tecidos. Todas as quimiocinas são peptídeos com peso molecular de 7KD-15KD, contendo cerca de 60 a 80 aminoácidos. Em sua estrutura, as quimiocinas apresentam quatro resíduos de cisteína conservados em quase todos os grupos, formando duas pontes dissulfeto intramoleculares essenciais. Possuem um curto domínio amino-terminal antecedendo a primeira cisteína, uma coluna estrutural ordenada formada por β -ligações com alça ligante entre a segunda e a quarta cisteína, além de uma α -hélice na região carbóxi-terminal com cerca de 20 a 30 aminoácidos (RAJARATHNAM et al., 1995).

Baseado no posicionamento das duas primeiras cisteínas pode-se classificar estruturalmente as quimiocinas. Estas cisteínas podem apresentar-se adjacientemente ligadas, formando o grupo denominado de CC ou α -quimiocinas; separadas por um aminoácido, denominado de CXC ou β -quimiocinas, ou ainda separadas por três aminoácidos, formando o grupo de quimiocinas CX₃C ou δ -quimiocinas.

As duas maiores subfamílias de quimiocinas são as do grupo CXC e CC, cujas atividades biológicas diferem quanto à capacidade de estimular diferentes tipos de células efetoras. As quimiocinas CXC atraem preferencialmente neutrófilos para o sítio inflamatório (FIGARELLA-BRANGER et al., 2003), enquanto que as quimiocinas CC ativam predominantemente eosinófilos, linfócitos, basófilos e monócitos (KAPP et al., 1994; ELSNER et al., 1996; KAPLAN, 2001; FIGARELLA-BRANGER et al., 2003). Ademais, as quimiocinas pertencentes à classe CC e CX₃C possuem maior seletividade para linfócitos, monócitos, linfócitos T e células NK.

Uma importante característica encontrada particularmente na família da quimiocinas CXC é a presença da seqüência de três aminoácidos (glutamato-leucina-arginina), localizados próximo ao domínio N-terminal, precedendo a primeira cisteína. A presença desta seqüência parece estar diretamente relacionada com a especificidade quimiotática sobre neutrófilos. Entre as quimiocinas CXC-ELR⁺ destacam-se a IL-8, MIP-2 e KC entre outras (ROLLINS, 1997; LAING e SECOMBES, 2004).

Dentre as quimiocinas CXC podemos destacar a quimiocina KC que é uma quimiocina encontrada em camundongos, esta quimiocina apresenta acentuada

homologia com a seqüência de aminoácidos da IL-8, sendo esta quimiocina sua correspondente em humanos e em ratos sua correspondente é a CINC. Existem trabalhos demonstrando a potente atividade quimiotática da quimiocina KC tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disto, a síntese e secreção destas quimiocinas podem ser induzidas por estímulos como LPS ou por citocinas como IL-1 β e TNF- α (INTRONA et al., 1987; SHEN et al., 1989; HENSLEY et al., 2003).

As quimiocinas ligam-se aos seus receptores acoplados a proteína G para produzir suas funções. Estas possuem dois principais sítios de interação com seu receptor, um deles localizado na região amino-terminal, essencial para a ativação do mesmo e, outro exposto dentro da alça de formação entre a segunda e terceira cisteína (CLARCK-LEWIS et al., 1991). Em humanos, cinco tipos de receptores para as quimiocinas da classe CXC foram identificados (CXCR₁ a CXCR₅), enquanto para a classe CC foram identificados oito tipos (CCR₁ a CCR₈) (MURPHY, 1996). Esses receptores podem estabelecer ligações com mais de uma quimiocina, e esta pode acoplar-se a mais de um tipo de receptor, demonstrando assim, promiscuidade e versatilidade. Os receptores CXCR₁ e o CXCR₂ formam ligações de alta afinidade com a IL-8, enquanto que para as quimiocinas da classe CC, os principais receptores envolvidos na migração leucocitária são o CCR1 e o CCR5, os quais estabelecem ligação com MIP-1 α e MIP-1 β , RANTES e MCP-3 (NEOTE et al., 1993; SU et al., 1996).

No presente trabalho, avaliamos a participação da quimiocina KC (CXC) tanto na resposta hipernociceptiva articular quanto na migração neutrofílica articular induzidas pela injeção i.art. de zimosan. Com o intuito de avaliar a participação da quimiocina KC foi utilizada como ferramenta farmacológica um antagonista dos receptores CXCR1/2 (DF2162),

A administração sistêmica de DF2162 (15mg/kg) resultou em inibição de 89% da resposta hipernociceptiva articular induzida pela administração i.art. de zimosan (30 μ g/5 μ L/articulação) (Figura 23 A). Enquanto que a migração neutrofílica articular foi reduzida em 82% quando comparada com o grupo zimosan (Figura 23 B). Estudos também relatam à presença de quimiocinas CXC em modelos de artrite reumatóide correlacionados com a migração de neutrófilos (KASAMA et al., 1995; CUZZOCREA et al., 2005).

Para confirmar o envolvimento da quimiocina KC na hipernocicepção articular induzida por zimosan em camundongos, a concentração desta quimiocina

foi determinada nas articulações inflamadas. A administração i.art. de zimosan 30µg/5µL estimulou a produção de KC em camundongos selvagens (Figura 24). Zimosan produziu um aumento na concentração de KC nas articulações detectadas 3 horas após a injeção de zimosan, sendo que o pico de liberação ocorreu no intervalo entre 3-5 horas.

Além disso, também foi avaliada os níveis da quimiocina KC na articulação de animais tratados com IL-1Ra e em animais deficientes para o receptor p55 do TNF- α . Observou-se redução na concentração de KC tanto no grupo tratado com IL-1Ra quanto nos animais deficientes para o receptor p55 (Figura 25). Os dados sugerem, portanto, que tanto TNF- α quanto IL-1 β parecem estar induzindo a produção de quimiocina KC.

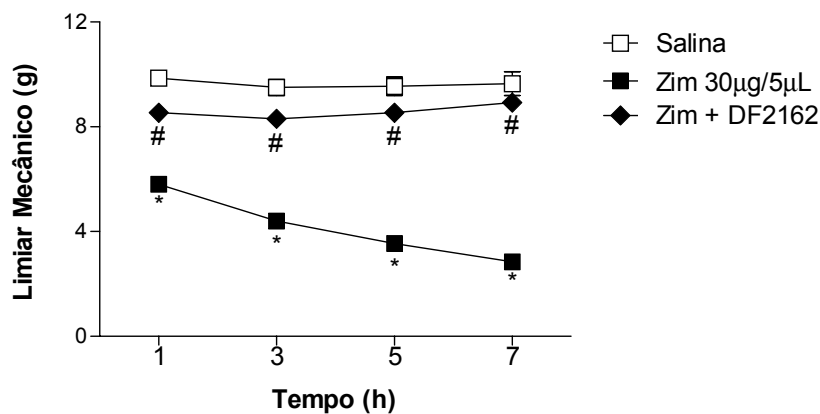
Ademais, em modelos experimentais de artrite foi evidenciada a importância das quimiocinas CXC nesta patologia, através do bloqueio destas quimiocinas e seus respectivos receptores CXCR1/2, fato que estabelece perspectivas de eficácia na terapêutica (PODOLIN, et al., 2002).

Recentemente, Coelho e colaboradores demonstraram no modelo de artrite induzida por antígeno que o bloqueio dos receptores CXCR1/2 resulta em inibição do recrutamento de neutrófilos devido a inibição da adesão dos neutrófilos na sinóvia. Como consequência observa-se redução da produção local de citocinas e redução da resposta hipernociceptiva (COELHO et al., 2008).

De maneira complementar, Cunha e colaboradores demonstram na artrite induzida por colágeno que a inibição dos receptores CXCR1/2 com DF2162 causou redução do influxo de neutrófilos, diminuição da formação do edema, redução do score clínico, além de reduzir a resposta hipernociceptiva (CUNHA et al., 2008).

Os dados do presente trabalho em conjunto com os resultados descritos na literatura demonstram o importante papel das quimiocinas CXCR1/2 na migração de leucócitos e na resposta hipernociceptiva em modelos de inflamação articular, sugerindo, portanto que o bloqueio dos receptores de quimiocinas é uma estratégia interessante para o controle tanto da migração de leucócitos quanto da resposta hipernociceptiva articular, até mesmo porque parece haver uma relação de dependência entre estes fenômenos inflamatórios em quadros de inflamação articular.

A



B

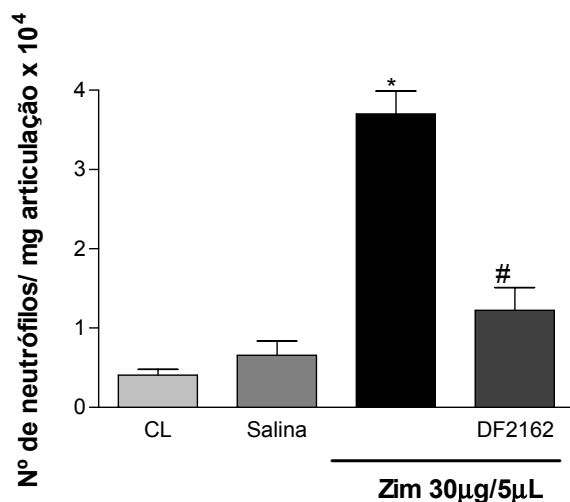


Figura 23 – Participação da quimiocina KC na resposta hipernociceptiva articular e na migração neutrofílica articular induzidas pelo zimosan em camundongos

Os animais foram pré-tratados com DF2162 (15mg/kg, v.o., 60 minutos) antes da administração de zimosan (30µg/5µL/articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 0-7 hs pelo teste de pressão crescente na pata (painel A) e migração leucocitária para o tecido articular avaliada no tempo de 7 hs pelo ensaio de atividade da mieloperoxidase (painel B). As barras representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # P<0,05 diferença significativa entre zimosan e o grupo tratado (DF2162)(ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

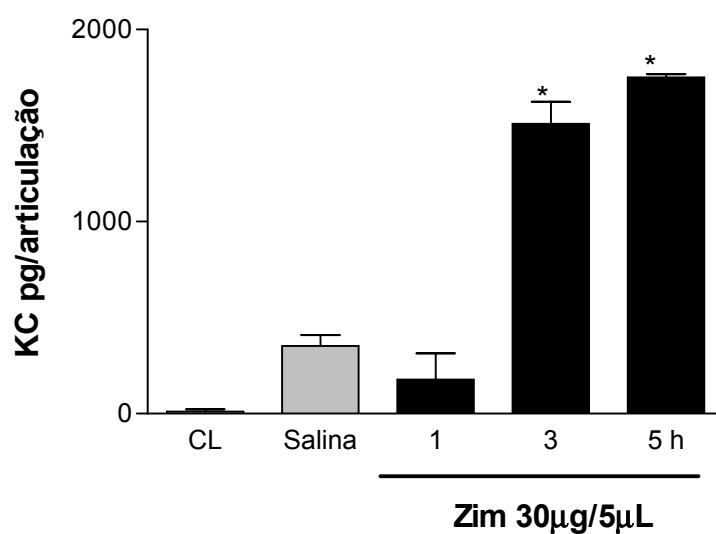


Figura 24 – Curso temporal da produção de KC após injeção de zimosan na articulação de camundongos

Concentração de KC nas articulações de camundongos injetadas com zimosan ($30\mu\text{g}/5\mu\text{L}/\text{articulação}$), salina ou articulações controle (contra-lateral). Nos seguintes tempos após a injeção (1, 3 e 5 h) os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem de KC, a qual foi determinada por ELISA (painel C). As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

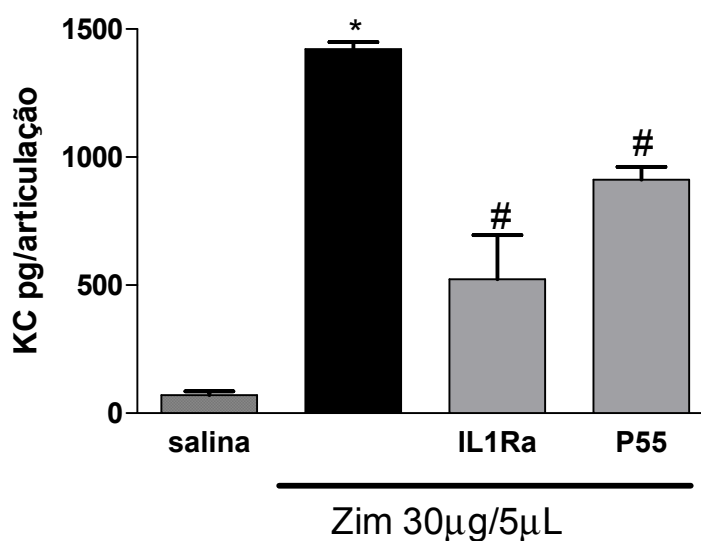


Figura 25 – Efeito do pré-tratamento com IL1Ra e camundongo deficiente para o receptor p55 sobre a produção de KC na articulação de camundongos

Concentração de KC nas articulações de camundongos injetadas com zimosan (30µg/5µL/articulação) ou salina. No tempo de 5 horas após a injeção intra-articular de zimosan os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem de KC, a qual foi determinada por ELISA (painel D). As barras representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle (salina).#P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo zimosan.

4.5 O efeito hipernociceptivo articular induzido pelo LPS em camundongos é dose-tempo-dependente

Com o intuito de investigar a participação dos receptores toll-like 4 e suas moléculas adaptadoras na resposta hipernociceptiva articular foi injetado intra-articularmente o agonista toll-like 4, LPS em três diferentes concentrações na articulação tíbio-tarsal. Foi realizada uma curva-dose-tempo-resposta de LPS com as doses de 100, 300 e 900ng, no intervalo de 1-24h pós-injeção. Evidenciou-se que não houve diferença significativa entre as doses de 300 e 900ng. O pico de resposta hipernociceptiva articular foi evidenciada no tempo de 5 horas pós-injeção (Figura 26). Por esta razão a dose de LPS utilizada nos próximos experimentos foi 300ng/5µL por articulação.

Para avaliarmos se o LPS na cavidade articular induzia a produção de citocinas tais como TNF- α , IL-1 β e quimiocina KC, foi utilizado o método de ELISA com amostras da articulação tíbio-tarsal injetadas com LPS e observou-se um aumento significativo da produção de TNF- α , KC e IL-1 β na 3 e 5 horas pós-injeção de LPS (300ng/5µL) quando comparadas com o grupo controle (Figura 27 A, B e C).

Uma vez que o LPS injetado intra-articular induz resposta hipernociceptiva articular a qual é acompanhada pela produção de citocinas e quimiocinas, o próximo passo foi avaliar se a inibição destas citocinas TNF- α , IL-1 β e quimiocina KC proporcionaria inibição da resposta hipernociceptiva articular e da migração neutrofílica articular induzidas pelo LPS. Para tal, foram utilizadas como ferramentas farmacológicas o DF2162 (antagonista CXCR1/2) e a IL1Ra (antagonista solúvel do receptor de IL-1) e para avaliação do TNF- α foram utilizados camundongos geneticamente modificados para o receptor p55 desta citocina. Evidenciou-se redução da resposta hipernociceptiva articular nos animais tratados com DF2162 (70%), IL-1Ra (62%) e nos animais geneticamente modificados para o receptor p55 (50%). Além disso, observou-se redução da migração neutrofílica articular nos animais tratados com DF2162 (77%), IL-1Ra (74%) e nos animais geneticamente modificados para o receptor p55 (76%) (Figura 28). Estes resultados demonstram que TNF- α , IL-1 β e quimiocina KC medeiam a resposta hipernociceptiva e a migração neutrofílica articular induzidas pelo LPS neste modelo de inflamação articular.

O LPS, uma endotoxina, é o principal constituinte da parede de bactérias Gram-negativas, o qual promove a síntese de várias citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-

6, TNF- α) por ativar receptores Toll-like 4 presentes em monócitos e macrófagos. Além disso, dados da literatura demonstram que o LPS induz resposta hipernociceptiva (KEMPER et al., 1998; WATKINS et al., 1994; CUNHA et al., 2000). Neste sentido, Ferreira e colaboradores demonstraram em modelo de hiperalgisia que o LPS induz a formação de bradicinina e que esta estimula a liberação de TNF- α (FERREIRA et al., 1993; POOLE et al., 1999). Além disso, Cunha e colaboradores demonstraram que o LPS injetado na pata de ratos induz a produção de TNF- α e IL-1 β (CUNHA et al., 2000). De maneira complementar, Watkins e colaboradores (1994) demonstraram que tanto TNF- α quanto IL-1 β estão envolvidos na hiperalgisia induzida pelo LPS.

Ademais, Bressan e colaboradores (2006) demonstraram que a injeção intra-articular de LPS no joelho de ratos previamente primados com carragenina induz incapacitação articular, migração celular e edema articular. Esses fenômenos inflamatórios são abolidos pelo pré-tratamento dos animais com anticorpo anti-TNF- α e anti-CINC-1. Surpreendentemente, neste modelo o anticorpo anti-IL-1 β não afetou a resposta de incapacitação, mas inibiu o edema articular e a migração celular. Estes resultados obtidos por Bressan corroboram, pelo menos em parte, com os resultados obtidos no presente trabalho. Uma vez que, os nossos resultados apresentados no presente trabalho demonstram que TNF- α , IL-1 β e quimiocina KC participam da resposta hipernociceptiva articular e que este fenômeno inflamatório apresenta uma correlação com a migração neutrofílica articular, uma vez que foi observada redução no número de neutrófilos que migraram para a articulação em resposta aos tratamentos e ao uso de animais deficientes do receptor p55.

Dados da literatura demonstram que o LPS, sinalizando via receptores Toll-like 4 tem sido usado extensivamente para agravar ou reativar a artrite em diferentes modelos (TERATO et al., 1996; YOSHINO et al., 2005; YOSHINO et al., 2000). Além disso, Stimpson e colaboradores demonstraram que o LPS injetado na articulação de ratos induz artrite (STIMPSON et al., 1987). É importante salientar que níveis elevados de citocinas e quimiocinas são encontrados no fluido sinovial de pacientes com artrite (BARKSBY et al., 2007). Portanto, estes resultados em conjunto com os obtidos no presente trabalho reforçam a idéia de que agonista Toll-like 4 (LPS) induz a liberação de citocinas e quimiocinas e que estas estão participando da resposta hipernociceptiva e da migração de neutrófilos articular, dois fenômenos inflamatórios importantes e debilitantes observados na fisiopatologia da artrite.

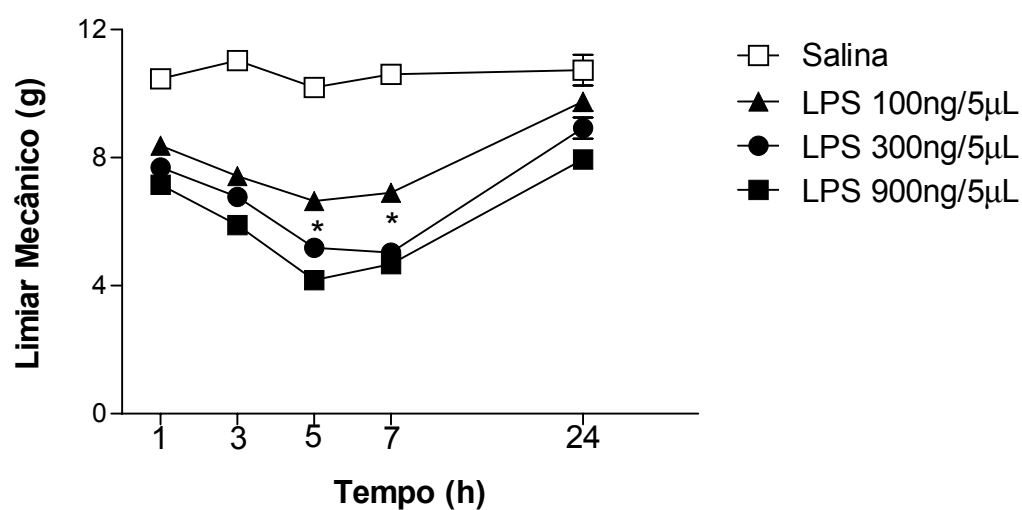


Figura 26 – O LPS induz resposta hipernociceptiva articular em camundongos

Curvas dose e tempo resposta de hipernocicepção articular induzida pela administração intra-articular de LPS (100, 300, 900ng/articulação) ou salina (controle). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 1-24 hs pelo teste de pressão crescente na pata. Os resultados são expressos pela média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença significativa comparado com o grupo salina (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

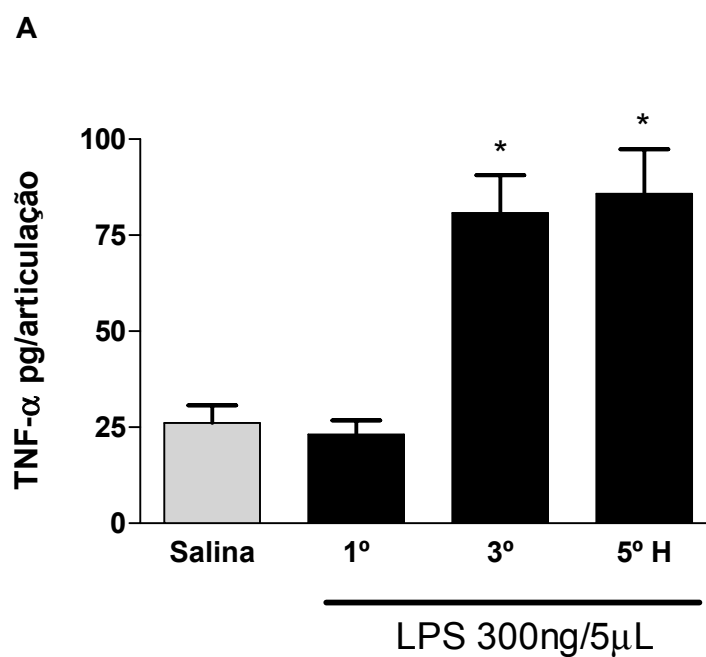


Figura 27A – Curso temporal da produção de TNF- α após injeção de LPS na articulação de camundongos

Concentração de TNF- α nas articulações de camundongos que receberam administração intra-articular de LPS (300ng/5 μ L/articulação) ou salina. Nos tempos de 1, 3 e 5 $^{\circ}$ horas após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem de TNF- α , a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle

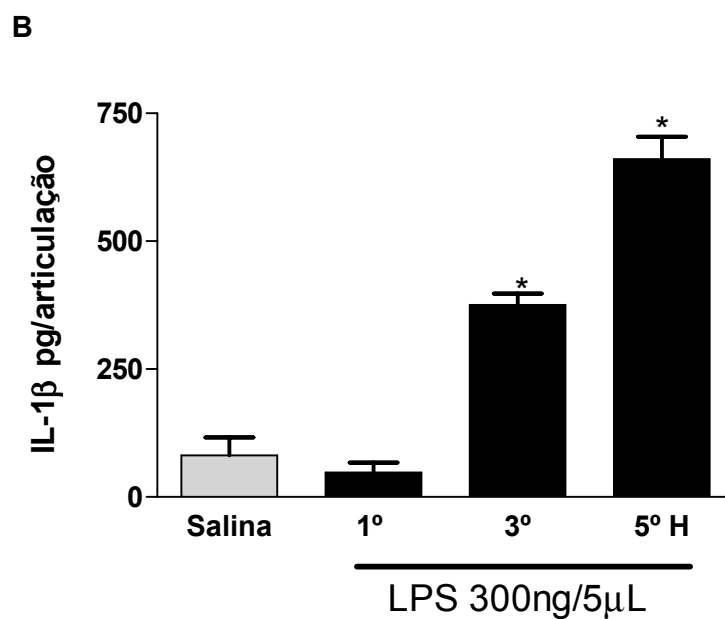


Figura 27B – Curso temporal da produção IL-1 β após injeção de LPS na articulação de camundongos

Concentração de IL-1 β nas articulações de camundongos que receberam administração intra-articular de LPS (300ng/5 μ L/articulação) ou salina. Nos tempos de 1, 3 e 5 horas após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulações foram extraídas para dosagem de IL-1 β , a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

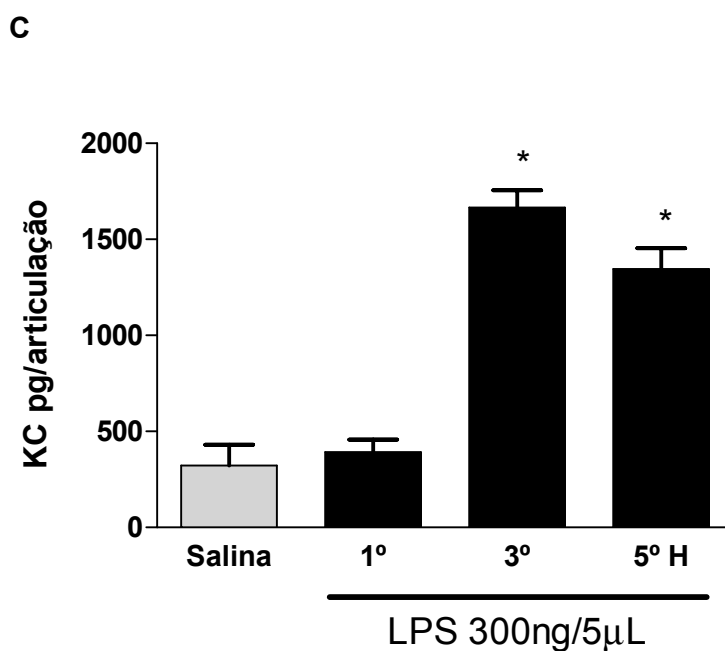


Figura 27C – Curso temporal da produção de KC após injeção de LPS na articulação de camundongos

Concentração de KC nas articulações de camundongos que receberam administração intra-articular de LPS (300ng/5µL/articulação) ou salina. Nos tempos de 1, 3 e 5 horas após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem de KC, a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

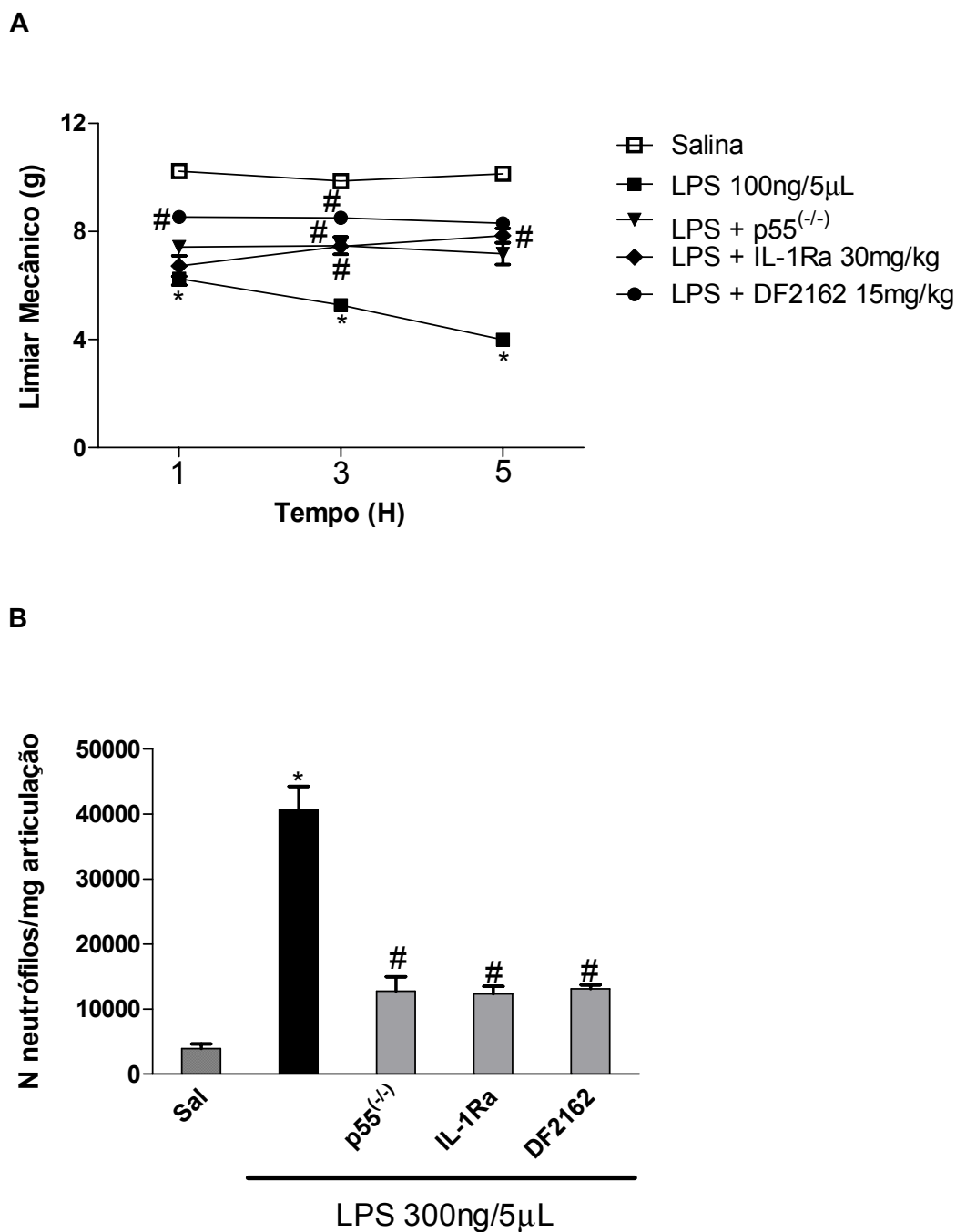


Figura 28 – Participação do TNF- α , IL-1 β e KC na resposta hipernociceptiva articular e na migração leucocitária articular induzidas pelo LPS em camundongos

Os animais foram pré-tratados com IL-1Ra (30mg/kg, i.v., 15 minutos), DF2162 (15mg/kg, v.o., 60 minutos) e p55^(-/-) antes da administração de LPS (300ng/5µL/articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 1-5 hs pelo teste de pressão crescente na pata (painel A) e migração leucocitária para o tecido articular avaliada no tempo de 5 hs pelo ensaio de atividade da mieloperoxidase (painel B). As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # P<0,05 diferença significativa entre LPS e os grupos tratados ou animais deficientes para o receptor p55 (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

4.6 O efeito hipernociceptivo articular induzido pelo LPS em camundongos é dependente de receptores TOLL-LIKE 4

Com a finalidade de avaliar a participação dos receptores TOLL-LIKE 4 na resposta hipernociceptiva articular, foram utilizados animais deficientes na via de sinalização para TOLL-LIKE 4. Os resultados demonstram inibição significativa da resposta hipernociceptiva articular no intervalo de 1-5^a h, após injeção i.art. de LPS (300 ng/5 μ L) em animais deficientes na via de sinalização para TOLL-LIKE 4 (HEJ) quando comparado com o respectivo controle selvagem (HEPAS). Sendo que na 5^a hora pós injeção i.art. de LPS observou-se 98% de inibição da redução do limiar mecânico articular nos animais deficientes na via de sinalização para TOLL-LIKE 4 quando comparado com o respectivo controle selvagem (HEPAS) (Figura 29 A). Além disso, foi avaliada a migração neutrofílica articular na 5^a hora pós injeção i.art. de LPS e observou-se uma redução de 97% da migração neutrofílica articular nos animais deficientes na via de sinalização para TOLL-LIKE 4 quando comparado com o respectivo controle selvagem (HEPAS) (Figura 29 B). Sugerindo assim, a participação do receptor TOLL-LIKE 4 tanto na resposta hipernociceptiva, quanto na migração neutrofílica articular em resposta ao LPS.

Para avaliar os mecanismos envolvidos nesta redução da resposta hipernociceptiva articular observada nos animais deficientes na via de sinalização para o receptor TOLL-LIKE 4, a concentração das citocinas foi determinada nas articulações que receberam LPS (300ng/5 μ L/articulação) e coletadas em tampão para citocinas nos tempos de 5^a horas pós-injeção. A administração i.art. de LPS 300ng/5 μ L estimulou a produção de TNF- α , IL-1 β e KC em camundongos selvagens. nos animais deficientes da via de sinalização para TOLL-LIKE 4 foi observada redução nos níveis destas citocinas e quimiocina (Figura 29 C, D e E). Também foram utilizados animais deficientes para o receptor TLR-2^(-/-) nestes animais não foram observadas redução da resposta hipernociceptiva articular ou da migração leucocitária articular, sendo que este resultado já era esperado, uma vez que o LPS atua via receptores TOLL-LIKE 4 (Figura 30). Já está bem estabelecido que o TLR-2 é requerido para o reconhecimento de bactérias Gram-positivas e fungos, enquanto o TLR-4 está relacionado com o reconhecimento de bactérias Gram-negativas (UNDERHILL et al., 1999).

Existem diversas demonstrações na literatura da expressão tanto de receptores TLR-2 quanto de TLR-4 no tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (JOOSTEN et al., 2003; SEIBL et al., 2003; KYBURZ et al., 2003). No entanto, este trabalho é o primeiro a demonstrar a participação destes receptores na resposta hipernociceptiva articular e que ainda existe uma correlação deste fenômeno com a migração leucocitária articular.

Além disso, dados da literatura demonstram que o LPS, sinalizando via TOLL-LIKE 4 pode agravar ou reativar a artrite em modelos que utilizam camundongos (TERATO et al., 1996; YOSHINO et al., 2005; YOSHINO et al., 2000). A importância de se estudar estes receptores, bem como as vias de sinalização envolvidas na resposta destes é importante uma vez que os receptores TOLL podem ser ativados por muitos ligantes endógenos que são liberados em processos de estresse ou dano tecidual. Neste sentido, receptores TOLL-LIKE 4 podem reconhecer componentes da matrix extracelular como o sulfato de heparan e fibronectina (JOHNSON et al., 2002; OKAMURA et al., 2001). Ainda, tanto o receptor TOLL-LIKE 4 como TOLL-LIKE 2 podem reconhecer componentes da matrix (SCHAFER et al., 2005). É importante salientar que ligantes endógenos de receptores toll-like 4 tais como fragmentos de fibronectina e proteínas de heat-shock tem sido encontradas na sinóvia reumatóide (SCOTT D., et al., 1981; ROELOFS MF, et al., 2005).

Recentemente, um grupo de pesquisadores demonstraram que a inibição do receptor Toll-like 4, com o uso de antagonista para o receptor Toll-like 4 suprime a severidade da artrite induzida por colágeno, além de determinar redução da expressão de IL-1 nas articulações afetadas (ABDOLLAHI-ROODSAZ et al., 2007).

Em conjunto, estes resultados demonstram a importante participação dos receptores Toll-like 4 na patofisiologia da artrite. Além disso, os resultados apresentados no presente trabalho sugerem o envolvimento tanto dos receptores Toll-like 2 quanto Toll-like 4 nos fenômenos de hipernocicepção articular e migração de neutrófilos para a cavidade articular observados nos quadros de inflamação articular induzida por diferentes estímulos.

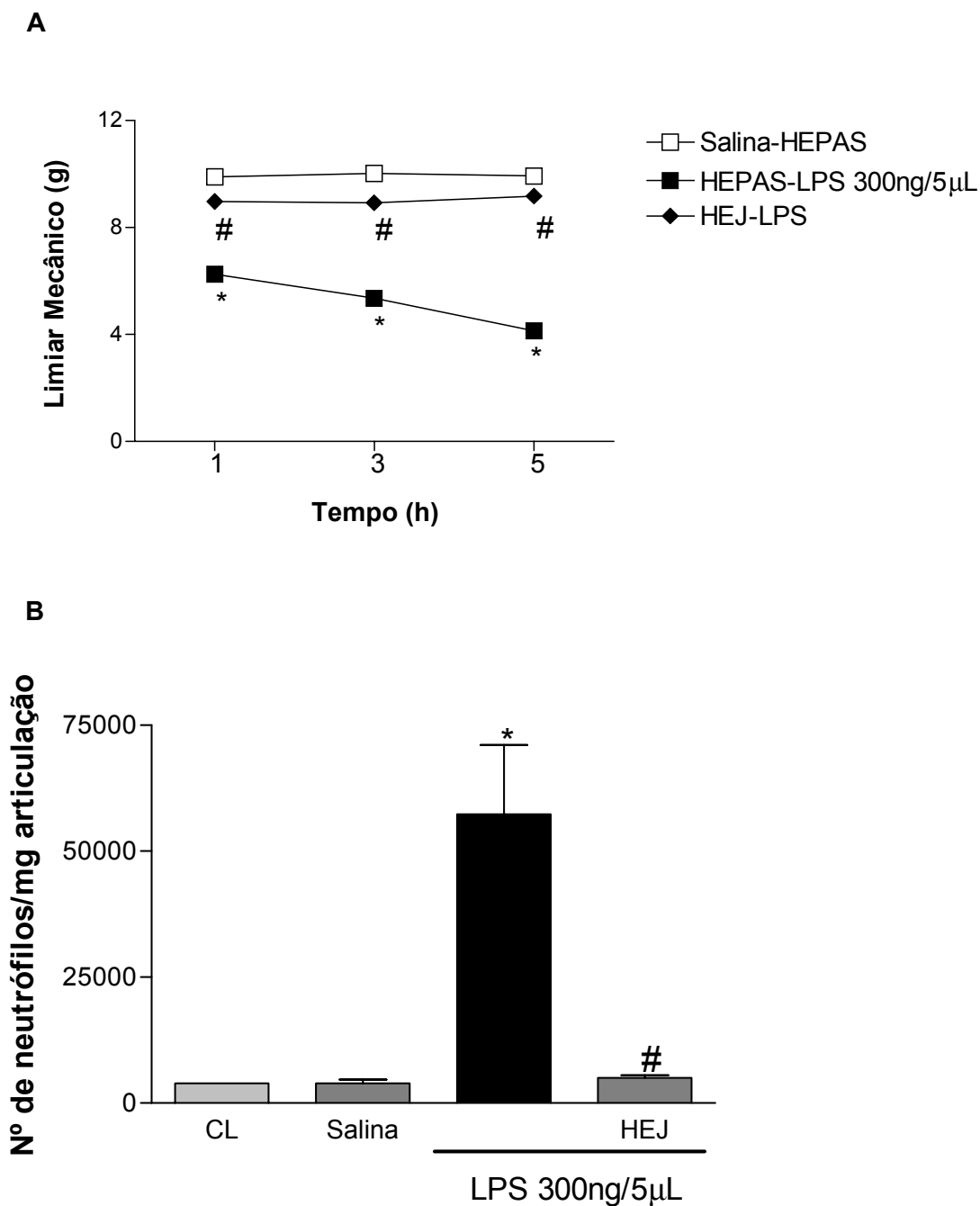


Figura 29 – Participação dos receptores Toll-like 4 na resposta hipernociceptiva e na migração neutrofílica articular induzidas pelo LPS em camundongos

Camundongos deficientes da via de sinalização para o receptor Toll-like 4 (HEJ) foram utilizados na avaliação da hipernocicepção articular mecânica e migração leucocitária no modelo de inflamação articular induzido por LPS (300ng/5µL/articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 1-5hs pelo teste de pressão crescente na pata (painel A) e migração leucocitária para o tecido articular avaliada no tempo de 5hs pelo ensaio de atividade da mieloperoxidase (painel B). As barras representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # P<0,05 diferença significativa entre LPS e o grupo TRL-4 (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

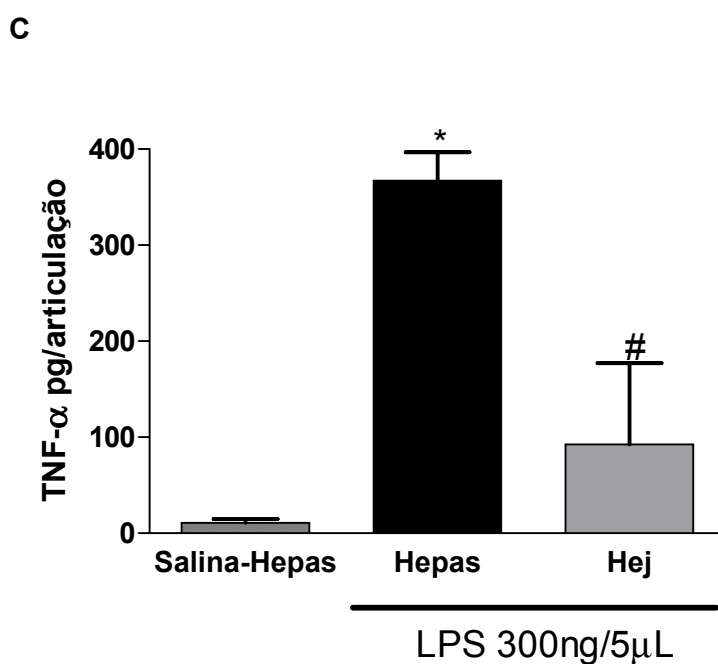


Figura 29C – Curso temporal da produção de TNF- α após injeção de LPS na articulação de camundongos deficientes da via de sinalização para Toll-like 4

Concentração de TNF- α nas articulações de camundongos que receberam administração intra-articular de LPS (300ng/5 μ L/articulação) ou salina. No tempo de 5 horas após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulações foram extraídas para dosagem de TNF- α , a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

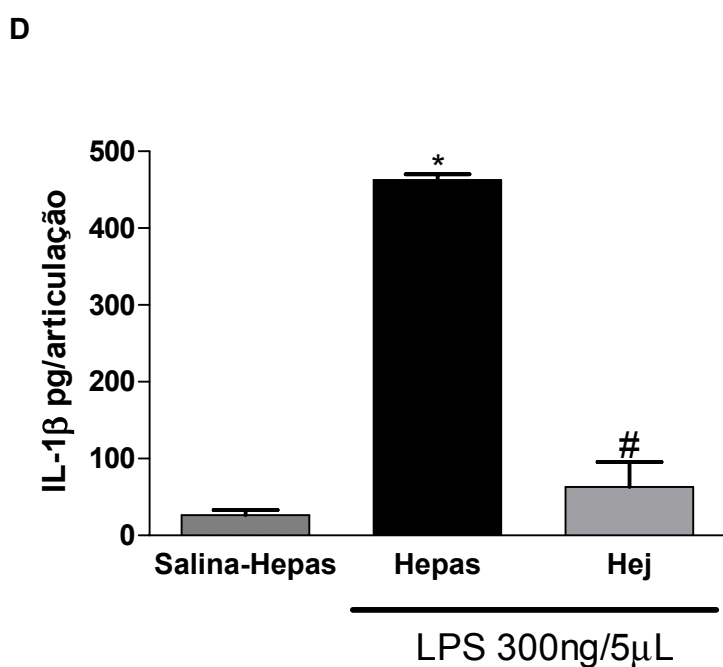


Figura 29D – Curso temporal da produção de IL-1 β após injeção de LPS na articulação de camundongos deficientes da via de sinalização para Toll-like 4

Concentração de IL-1 β nas articulações de camundongos que receberam administração intra-articular de LPS (300ng/5 μ L/articulação) ou salina. No tempo de 5 horas após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulações foram extraídas para dosagem de IL-1 β , a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

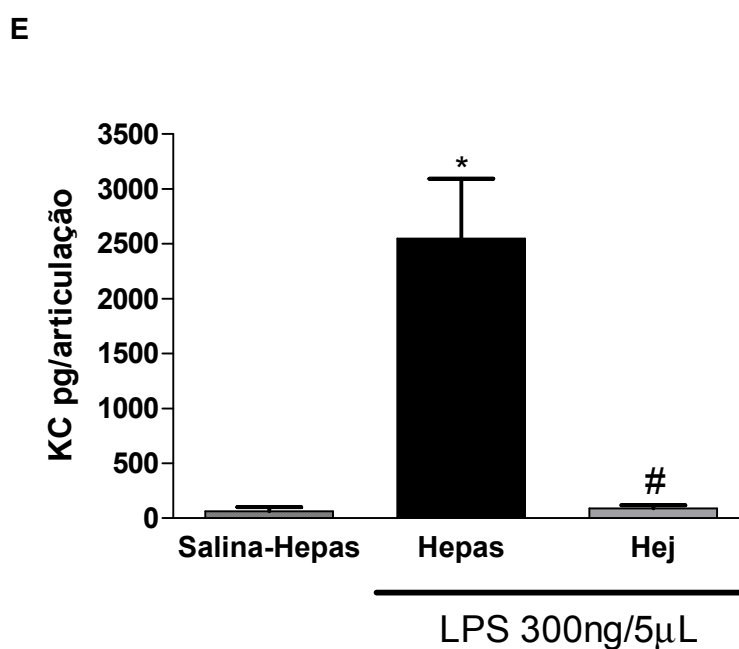


Figura 29E – Curso temporal da produção de KC após injeção de LPS na articulação de camundongos deficientes da via de sinalização para Toll-like 4

Concentração de KC nas articulações de camundongos que receberam administração intra-articular de LPS (300ng/5µL/articulação) ou salina. No tempo de 5 horas após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulações foram extraídas para dosagem de KC, a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

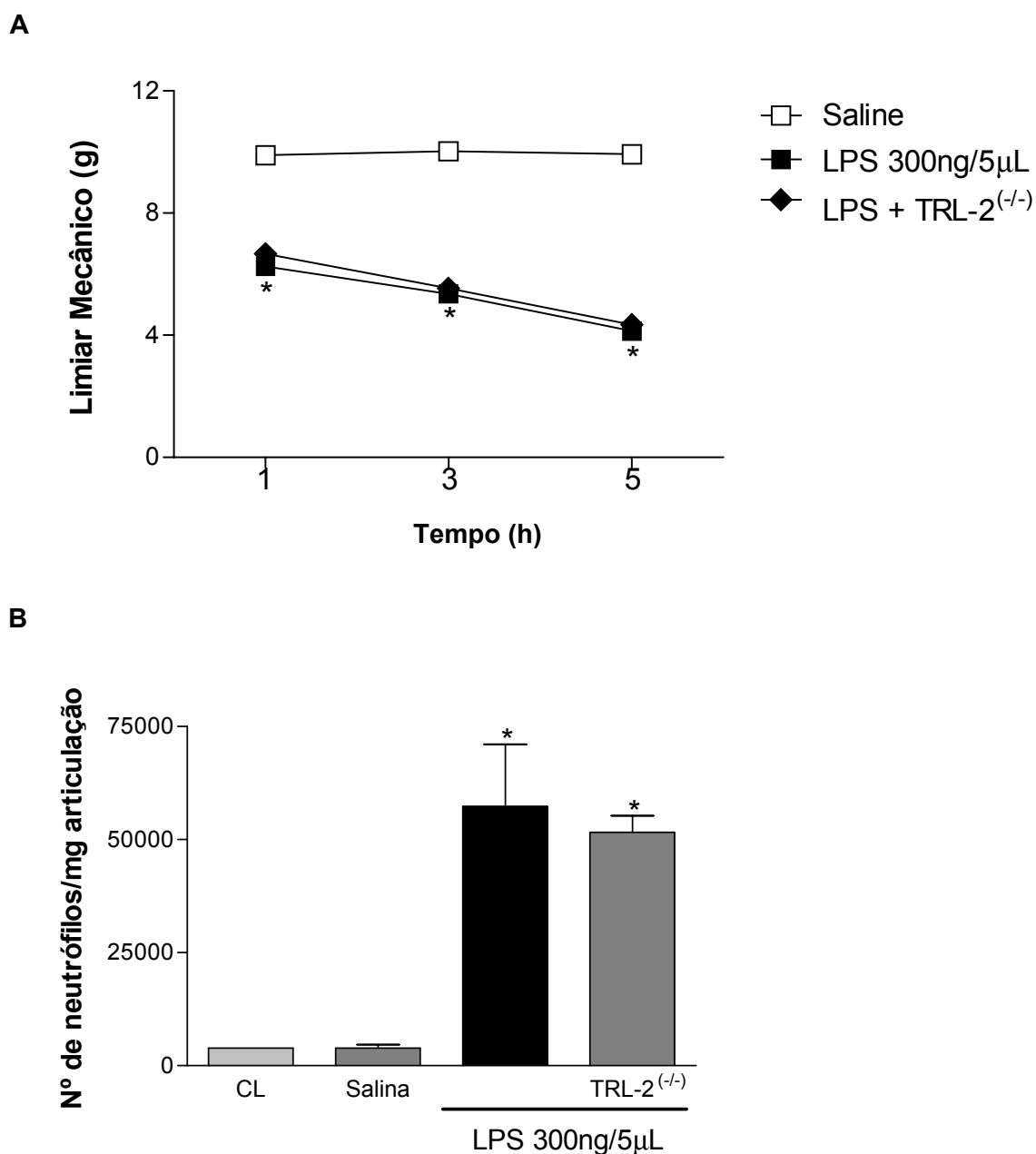


Figura 30 – Receptores toll-like 2 não participa da resposta hipernociceptiva e da migração neutrofílica articular induzidas pelo LPS em camundongos

Camundongos deficientes para o receptor TRL-2 (TRL-2^(-/-)) foram utilizados na avaliação da hipernocicepção articular mecânica e migração leucocitária no modelo de inflamação articular induzido por LPS (300ng/5µL/articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 1-5hs pelo teste de pressão crescente na pata (painel A) e migração leucocitária para o tecido articular avaliada no tempo de 5hs pelo ensaio de atividade da mieloperoxidase (painel B). As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # P<0,05 diferença significativa entre LPS e o grupo (TRL-2^(-/-)) (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

4.7 O efeito hipernociceptivo articular induzido pelo LPS em camundongos é dependente das moléculas adaptadoras MyD88 e MAL/TIRAP, mas é independente de TRIF

Seguindo a mesma linha de raciocínio apresentada no item anterior, foi avaliada a participação das moléculas adaptadoras MyD88, MAL/TIRAP e TRIF na resposta hipernociceptiva articular e na migração neutrofílica articular induzidas pelo LPS. Para tal, foram utilizados animais deficientes para estas moléculas. Foi observado nos animais MyD88^(-/-) 85% de inibição da redução do limiar mecânico (Figura 31 A). Enquanto nos animais MAL/TIRAP^(-/-) foi evidenciada um aumento de 56% do limiar mecânico (Figura 31 A). Além disso, também foi avaliada a migração de neutrófilos para o tecido articular e evidenciou-se uma redução de 97% na migração neutrofílica articular nos animais MYD88^(-/-) e 69% nos animais MAL/TIRAP^(-/-) (Figura 31 B). De maneira complementar foi avaliada a concentração de citocinas TNF- α , IL-1 β e quimiocina KC nos animais MyD88^(-/-) MAL/TIRAP^(-/-) e observou-se redução na concentração destas citocinas e quimiocinas nos animais deficientes quando comparados com o respectivo controle (Figura 32 A, B e C). Também foi avaliada a participação da molécula TRIF tanto na resposta hipernociceptiva articular quanto na migração de neutrófilos e não foi observada diferença significativa nos animais TRIF^(-/-) quando comparados com o respectivo controle SV129 (Figura 33 A e B). Ademais, também não foi evidenciada diferença na concentração das citocinas TNF- α , IL-1 β e quimiocina KC nos animais TRIF^(-/-) quando comparados com o controle (Figura 34 A, B e C).

Os resultados sugerem a participação das moléculas MyD88 e MAL/TIRAP na resposta hipernociceptiva articular e na migração neutrofílica articular. Além disso, estas moléculas estão participando diretamente da produção de citocinas TNF- α , IL-1 β e quimiocina KC, uma vez que a concentração destas estava reduzida no tecido articular nos animais deficientes para esta molécula. Por outro lado, os resultados demonstram que a molécula TRIF não participa da resposta hipernociceptiva articular e migração de neutrófilos articular neste modelo de inflamação articular.

As vias de sinalização ativadas através de receptores TOLL-LIKE 4 requerem a molécula adaptadora MyD88. A molécula MyD88 apresenta um domínio N-terminal (DD), que medeia interações proteína-proteína e está envolvido em

resposta de citotoxicidade, ativação de MAPK e ativação de fatores de transcrição como NF- κ B. Estudos usando camundongos geneticamente modificados mostraram que existem duas vias de sinalização dos receptores TOLL-LIKE 4 uma via dependente de MyD88 e outra independente de MyD88. Uma segunda proteína adaptadora a ser descrita foi a Mal, trabalhos utilizando camundongos geneticamente modificados para Mal demonstraram que esta molécula trabalha em conjunto com a molécula MyD88 (PALSSON-MCDERMOTT et al., 2004). Existem demonstrações de que esta via de sinalização dependente de MyD esta relacionada com a ativação de NF- κ B, produção de citocinas pró-inflamatórias e resposta Th1. Neste sentido, Sacre e colaboradores demonstraram que em culturas de tecido sinovial de pacientes com artrite tanto a molécula MyD88 quanto a molécula MAL/TIRAP estão envolvidas na produção de citocinas e metaloproteinases. (SACRE et al., 2007). Estes achados estão de acordo com os achados do presente estudo, uma vez que foi observada redução na produção de citocinas TNF- α , IL-1 β e quimiocina KC no tecido articular de animais deficientes para a molécula MyD88 e MAL/TIRAP.

É interessante salientar que no presente trabalho evidenciou-se que nos animais deficientes para as moléculas MyD88 e MAL/TIRAP observou-se redução da resposta hipernociceptiva articular e da migração de neutrófilos para a cavidade articular, sugerindo, portanto papel relevante destas moléculas nestes dois fenômenos inflamatórios. E que, além disso, estas moléculas podem ter relevância no desenvolvimento de drogas, com efeito, analgésico e antiinflamatório.

A molécula TRIF pertence a via de sinalização independente de MyD88. Importantes evidências do papel de TRIF nas vias de sinalização para Toll-like 4 tem sido feitas por Yamamoto e colaboradores, que utilizaram animais deficientes para a molécula TRIF para mostrar o envolvimento do TRIF nas vias independentes de MyD88 na resposta ao LPS. A via dependente de TRIF induz a expressão de IFN-1 a qual é mediada através de TBK1 e IKK ϵ (FITZGERALD et al., 2003; TOSHCHAKOV et al., 2002). A porção C-terminal do TRIF tem estado associada com RIIP1 causando um atraso na ativação do NF- κ B (MEYLAN et al., 2004). Além disso, TRIF foi demonstrado ativar NF- κ B, embora menos potentemente que a ativação por MyD88 e MAL/TIRAP. Por outro lado, TRIF é mais potente indutor de IFN- β que MyD88 e MAL/TIRAP (PALSSON-MCDERMOTT et al., 2004). Além disso,

existem demonstrações que a inflamação induzida pela administração de cristais de ácido úrico é dependente da participação da molécula MyD88, mas é independente da participação da molécula TRIF (CHEN et al., 2006).

É importante ressaltar que a sinalização via MyD88 é ativada antes que a via de sinalização TRIF (KAWAI et al., 2001). No presente trabalho, os resultados demonstram que neste modelo de inflamação articular a molécula TRIF não está participando da resposta hipernociceptiva articular e da migração neutrofílica articular. De maneira complementar a concentração de citocinas detectados nos animais deficientes para a molécula TRIF apresentou-se na mesma concentração das citocinas observadas nos animais selvagens. Os resultados sugerem, portanto, que a molécula TRIF não participa da inflamação articular induzida pelo LPS.

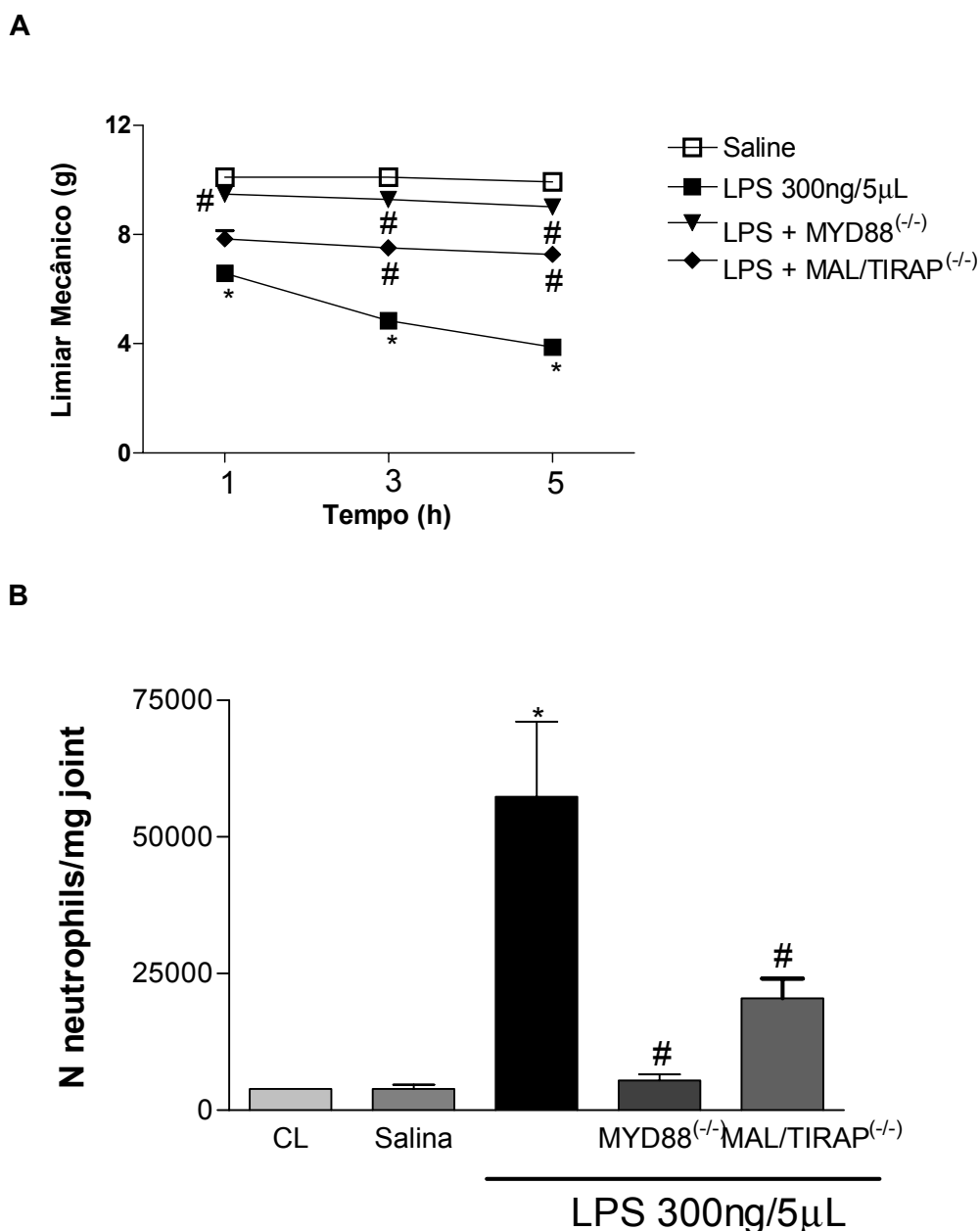


Figura 31 – Efeito do MYD88 na resposta hipernociceptiva e na migração neutrofílica articular induzidas pelo LPS em camundongos

Camundongos deficientes para a molécula MYD88 (MYD88^(-/-)) foram utilizados na avaliação da hipernocicepção articular mecânica e migração leucocitária no modelo de inflamação articular induzido por LPS (300ng/5µL/articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 1-5hs pelo teste de pressão crescente na pata (painel A) e migração leucocitária para o tecido articular avaliada no tempo de 5hs pelo ensaio de atividade da mieloperoxidase (painel B). As barras representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # P<0,05 diferença significativa entre LPS e os grupos (MYD88^(-/-)) (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

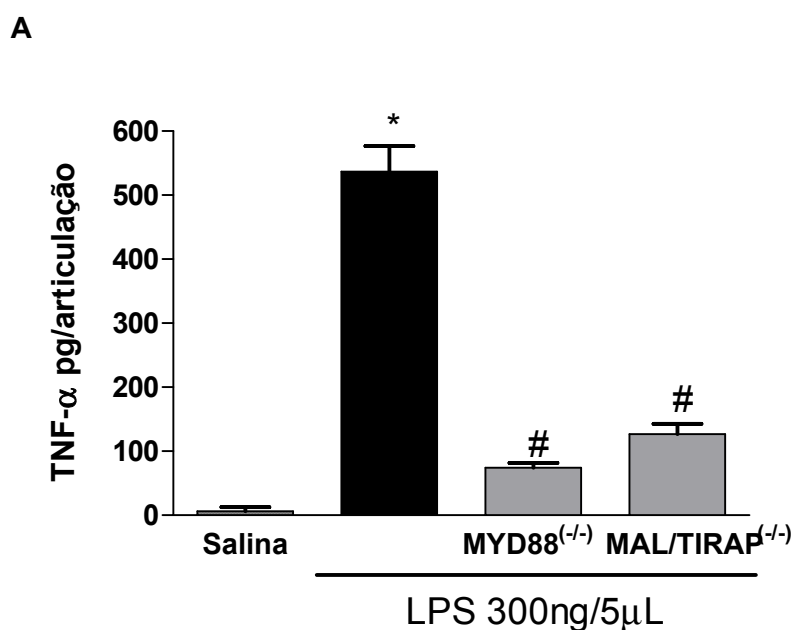


Figura 32A – Curso temporal da produção de TNF- α após injeção de LPS na articulação de camundongos deficientes para as moléculas MYD88 e MAL/TIRAP

Concentração de TNF- α nas articulações de camundongos que receberam administração intra-articular de LPS (300ng/5 μ L/articulação) ou salina. No tempo de 5^o horas após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem de TNF- α , a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle

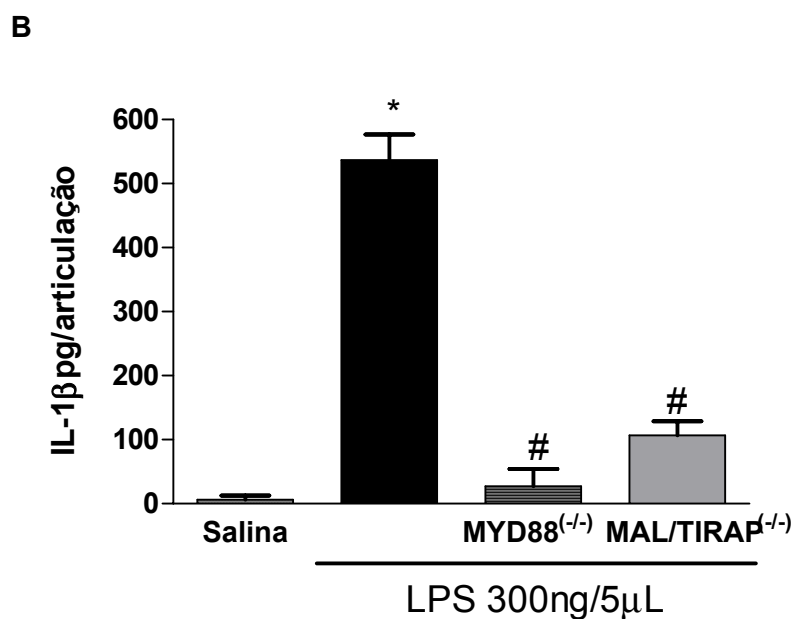


Figura 32B – Curso temporal da produção de IL-1 β após injeção de LPS na articulação de camundongos deficientes para as moléculas MYD88 e MAL/TIRAP

Concentração de IL-1 β nas articulações de camundongos que receberam administração intra-articular de LPS (300ng/5 μ L/articulação) ou salina. No tempo de 5 horas após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulações foram extraídas para dosagem de IL-1 β , a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

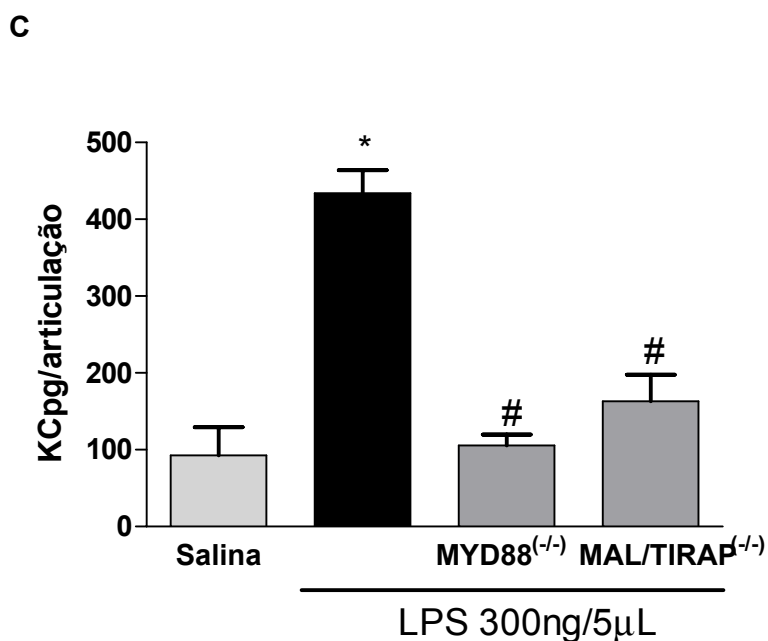


Figura 32C – Curso temporal da produção de KC após injeção de LPS na articulação de camundongos deficientes para as moléculas MYD88 e MAL/TIRAP

Concentração de KC nas articulações de camundongos que receberam administração intra-articular de LPS (300ng/5µL/articulação) ou salina. No tempo de 5 horas após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem de KC, a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

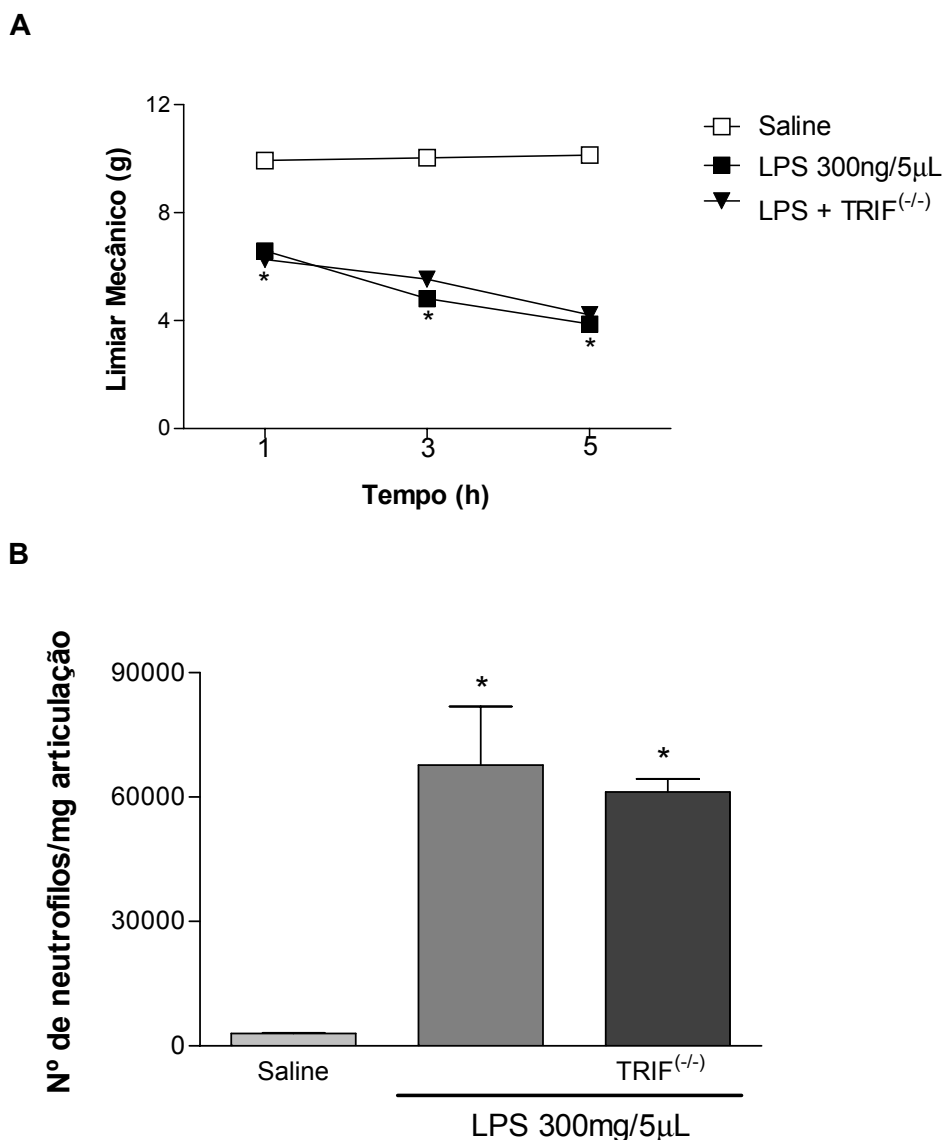


Figura 33 – Efeito do TRIF na resposta hipernociceptiva e na migração neutrofílica articular induzidas pelo LPS em camundongos

Camundongos deficientes para a molécula TRIF (TRIF^(-/-)) foram utilizados na avaliação da hipernocicepção articular mecânica e migração leucocitária no modelo de inflamação articular induzido por LPS (300ng/5μL/articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 1-5hs pelo teste de pressão crescente na pata (painel A) e migração leucocitária para o tecido articular avaliada no tempo de 5hs pelo ensaio de atividade da mieloperoxidase (painel B). As barras representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo salina (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

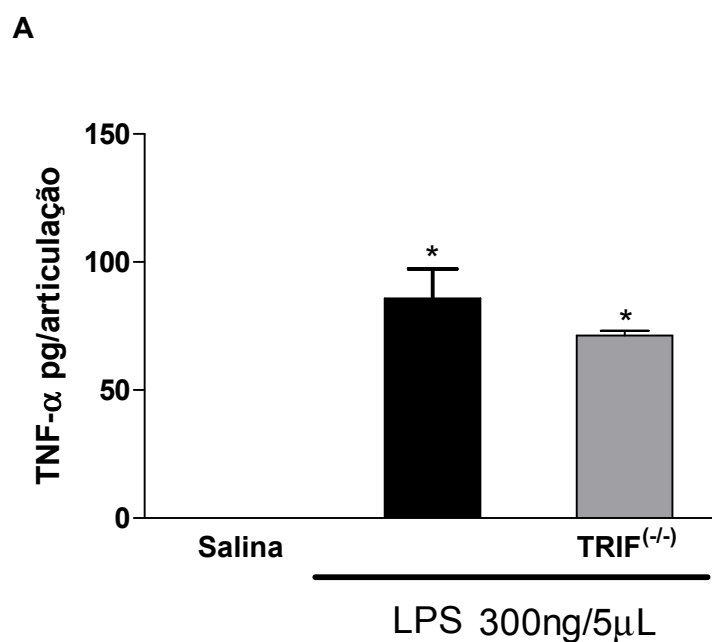


Figura 34A – Curso temporal da produção de TNF- α após injeção de LPS na articulação de camundongos deficientes para a molécula TRIF

Concentração de TNF- α nas articulações de camundongos que receberam administração intra-articular de LPS (300ng/5 μ L/articulação) ou salina. No tempo de 5 horas após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulações foram extraídas para dosagem de TNF- α , a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

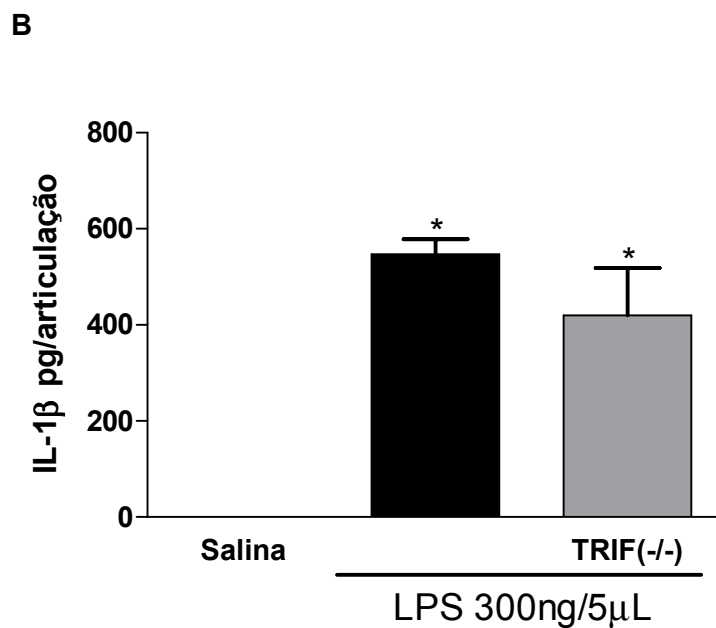


Figura 35B – Curso temporal da produção de IL-1 β após injeção de LPS na articulação de camundongos deficientes para a molécula TRIF

Concentração de IL-1 β nas articulações de camundongos que receberam administração intra-articular de LPS (300ng/5 μ L/articulação) ou salina. No tempo de 5 horas após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulações foram extraídas para dosagem de IL-1 β , a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

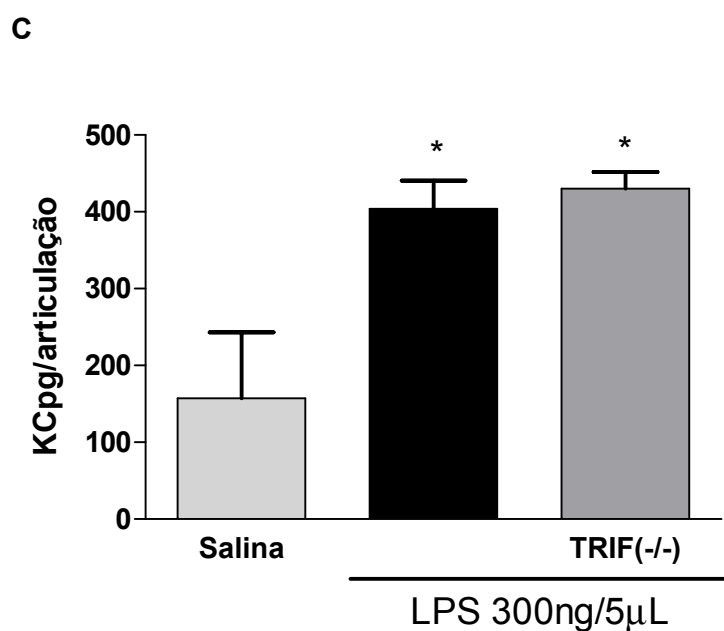


Figura 34C – Curso temporal da produção de KC após injeção de LPS na articulação de camundongos deficientes para a molécula TRIF

Concentração de KC nas articulações de camundongos que receberam administração intra-articular de LPS (300ng/5µL/articulação) ou salina. No tempo 5 horas após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem de KC, a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

4.8 TNF- α induz hipernociceção mecânica articular em camundongos: Papel de quimiocinas CXCR1/2, IL-1 β , aminas simpáticas e prostaglandinas

Com o objetivo de se estabelecer uma relação hierárquica entre os mediadores responsáveis pela gênese da hipernociceção inflamatória articular, os próximos passos foram investigar a hierarquia da síntese das citocinas TNF- α , IL-1 β quimiocina KC nos efeitos hipernociceptivos articulares. Para tal, foram estabelecidos doses e tempos respostas de hipernociceção articular para cada uma das citocinas e quimiocinas que participa do efeito hipernociceptivo articular.

Desta forma, a injeção intra-articular de TNF- α induziu resposta hipernociceptiva mecânica articular de maneira dose (1 - 1000 pg) e tempo (1 - 24 h) dependentes (Figura 35 A). A resposta hipernociceptiva articular máxima foi observada com a dose de 100 pg de TNF- α . A resposta hipernociceptiva articular foi significativa da 1 h até a 5 h após a injeção intra-articular de TNF- α , a qual retornou aos níveis normais em 24 h (Figura 35).

Para avaliar a participação de prostaglandinas e aminas simpáticas foram realizados o pré-tratamento com indometacina (inibidor da ciclooxigenase) e guanetidina (depletor periférico de aminas simpáticas) e associação de indometacina e guanetidina. A hipernociceção articular induzida pelo TNF- α foi parcialmente inibida pelo pré-tratamento sistêmico com indometacina (51%) e guanetidina (48%), sendo efetivamente inibida pela associação de indometacina e guanetidina (84%)(Figura 36).

Além disso, foi avaliada a participação da citocina IL-1 β . Para tal, foi utilizada como ferramenta farmacológica IL1Ra (antagonista do receptor de IL-1). Também foi avaliada a participação das quimiocinas CXCR1/2, com este intuito foi utilizado DF2162 (antagonista CXCR1/2). Foi observada que a resposta hipernociceptiva articular induzida pelo TNF- α na 5 h foi parcialmente inibida pelo pré-tratamento sistêmico dos animais com IL-1Ra (33,5%) e DF2162 (40,5%) (Figura 37).

Os resultados sugerem a participação de prostanóides, aminas simpáticas, IL-1 β e quimiocinas CXCR1/2 na resposta hipernociceptiva articular induzida pela administração intra-articular de TNF- α .

Como o pré-tratamento dos animais com IL-1Ra e DF2162 causou uma redução da resposta hipernociceptiva articular induzida pelo TNF- α . O próximo passo foi avaliar se o TNF- α injetado intra-articularmente é capaz de induzir a produção de IL-1 β e quimiocina KC. Para tal, foram avaliadas as concentrações articulares de IL-1 β e quimiocina KC após a injeção intra-articular de TNF- α (100pg/5 μ L/articulação) no tempo de 5 horas após a injeção. Pois este tempo corresponde ao tempo de resposta hipernociceptiva articular máxima induzida pelo TNF- α (Figura 38).

As concentrações articulares de IL-1 β e quimiocina KC foram avaliadas em articulações de animais controle (salina) e grupo estudo (TNF- α 100pg/5 μ L/articulação). As concentrações foram determinadas pelo ensaio de ELISA. Os resultados demonstram um aumento significativo das concentrações de IL-1 β e quimiocina KC após administração intra-articular de TNF- α quando comparados ao grupo controle (Figura 38A e B).

Já está bem estabelecido, tanto em ratos quanto em camundongos, que nas respostas inflamatórias a liberação de mediadores hiperalgésicos é secundária a liberação de citocinas (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1991; CUNHA et al., 1992; CUNHA et al., 2005). Neste contexto, citocinas parecem constituir uma ligação entre lesão celular e reconhecimento de agentes exógenos e o desenvolvimento de sinais e sintomas característicos da inflamação local e sistêmica, como migração celular, edema, hiperalgesia, febre e liberação de proteínas de fase aguda. Assim, a próxima hipótese testada foi de que também neste modelo de inflamação articular em camundongos as citocinas medeiam a hipernocicepção articular mecânica inflamatória e que elas são as responsáveis pela liberação dos mediadores finais. Dentre estas citocinas, destaca-se o TNF- α que é uma citocina liberada durante o processo inflamatório, a qual apresenta um papel importante na hipernocicepção inflamatória (CUNHA et al., 1992; WATKINS et al., 1995; CUNHA et al., 2005). Muitos tipos de células, incluindo macrófagos, queratinócitos, fibroblastos e neutrófilos produzem TNF- α . Além disso, mastócitos não somente produzem esta citocina, como podem armazená-la em seus grânulos (CORSINI and GALLI, 1998; FUJISAWA et al., 1997; DJEU et al., 1990).

Tanto o nosso grupo quanto outros têm demonstrado que o TNF- α apresenta propriedades hipernociceptivas. A injeção intraplantar de TNF- α em ratos

e em camundongos produz hipernocicepção mecânica. Esta resposta hipernociceptiva tanto em ratos quanto em camundongos depende da síntese/liberação de uma cascata de citocinas pro-inflamatórias que antecede a liberação dos mediadores finais: prostaglandinas e aminas simpáticas. Em camundongos, Cunha e colaboradores em 2005 demonstraram que a cascata de citocinas na resposta hipernociceptiva plantar, inicia-se com o TNF- α , agindo no receptor TNFR1, e KC, os quais estimulam a liberação de IL-1 β . Os mediadores finais desta cascata são as prostaglandinas liberadas pela IL-1 β e as aminas simpáticas liberadas pelo KC. Estes resultados demonstram o conceito de que a liberação dos mediadores finais da hipernocicepção inflamatória plantar em camundongos é precedida por uma cascata de citocinas. No entanto, estes resultados foram demonstrados em modelo de hipernocicepção plantar. No presente trabalho está se avaliando a presença ou não de uma cascata de citocinas em um modelo de hipernocicepção mecânica articular.

Neste contexto, o efeito hiperalgésico do TNF- α em doenças articulares tem sido bem demonstrado em modelos experimentais e em estudos clínicos. Neste sentido, Tonussi e Ferreira demonstraram usando o teste de incapacitação em ratos, que o TNF- α esta envolvido na incapacitação articular induzida por carragenina. Ademais, trabalhos têm correlacionado a produção de TNF- α com a dor observada no movimento mandibular em pacientes que apresentam dor articular temporomandibular (NORDAHL, et al., 2000). De maneira complementar, Alestergren e colaboradores (2006), demonstraram que o controle insuficiente de TNF- α endógeno parece contribuir diretamente para a dor temporomandibular e a destruição tecidual observada em pacientes com artrite reumatóide. Além do efeito hiperalgésico do TNF- α demonstrado após a administração desta citocina, esta também pode apresentar um efeito indireto na sensibilização do nociceptor devido a estimular a produção de outras citocinas, tais como IL-1 β , a qual tem demonstrada a capacidade de induzir dor e hiperalgesia (WATKINS, et al., 1995; SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995; KOPP, 1998; ALSTERGREN et al., 1998).

Existem dados na literatura que a inibição da atividade do TNF- α suprime a produção de IL-1 e IL-6 em pacientes com artrite inflamatória crônica (BRENNAN et al, 1989; WILLIAMS et al., 1992; FELDMANN et al., 1996). Além disso, existem várias evidências que sugerem a importância do TNF- α na fisiopatologia das

doenças articulares inflamatórias. A citocina TNF- α tem sido identificada na membrana sinovial e especialmente na junção pannus-cartilagem de pacientes com artrite reumatóide (CHU et al., 1991). De maneira complementar, tem sido demonstrado que a dor observada na articulação temporomandibular está relacionada com os níveis de TNF- α no fluido sinovial (NORDAHL et al., 2000). Além disso, têm demonstrações de que TNF- α seja espontaneamente produzido em cultura de células sinoviais de pacientes com artrite reumatóide (BRENNAN et al., 1991).

Ademais, TNF- α induz a reabsorção da cartilagem e osso e inibe a síntese de proteoglicanos e colágeno na cartilagem (BERTOLINI et al., 1986; SAKLATVALA, 1986; REGINATO et al., 1991). Além disso, a referida citocina induz a liberação de prostaglandina E2 e colagenase por células sinoviais (DAYER et al., 1985). Este dado está de acordo com os achados no presente trabalho, pois se observou que os animais que receberam injeção intra-articular de TNF- α e pré-tratamento com indometacina (inibidor da ciclooxigenase) apresentaram significativa redução da resposta hipernociceptiva articular. Sugerindo, portanto, a participação de prostaglandinas neste processo. É importante ressaltar que o pré-tratamento dos animais com guanetidina também apresentou redução da resposta hipernociceptiva articular induzida pelo TNF- α . Ainda, associação desta droga com indometacina aumentou o efeito analgésico observado sobre a hipernocicepção articular induzida pelo TNF- α , sugerindo, portanto, a participação de aminas simpáticas e de prostanóides nesta resposta hipernociceptiva articular. Já está bem estabelecido que os prostanóides e aminas simpáticas causam sensibilização do nociceptor.

No entanto, a liberação destes mediadores é precedida pela liberação de citocinas. No modelo de hipernocicepção plantar em camundongos foi demonstrado que o TNF- α causa resposta hipernociceptiva e que esta resposta é dependente da participação de prostaglandinas (CUNHA et al., 2005). O que difere do presente modelo, pois neste, o TNF- α induz participação tanto de prostaglandinas quanto de aminas simpáticas. Uma possível explicação para este fato é que o TNF- α estaria liberando quimiocina KC que estaria atuando via aminas simpáticas.

Dados da literatura têm demonstrado tanto em modelos de hiperalgesia quanto em modelos de artrite que o TNF- α induz a produção de outras citocinas como IL-1 β e IL-8 (correspondente a KC em camundongos) (WILLIAMS et al., 1992;

OGURA et al., 2005; CUNHA et al., 2005). Dados obtidos no presente trabalho, demonstraram redução na resposta hipernociceptiva articular induzida pela administração intra-articular de TNF- α quando os animais receberam pré-tratamento com IL-1Ra e DF 2162. Além disso, foi confirmada com a técnica de ELISA que a administração intra-articular de TNF- α induziu a produção de IL-1 β e quimiocina KC na articulação tíbio-tarsal de camundongos. Os resultados obtidos demonstram a participação da citocina IL-1 β e quimiocina KC na resposta hipernociceptiva articular induzida por TNF- α injetado na articulação tíbio-tarsal de camundongos.

Finalizando, existem várias evidências que demonstram que o TNF- α seja um eficiente alvo terapêutico para o controle das dores inflamatórias. Nesse sentido várias drogas têm sido desenvolvidas para o tratamento de doenças inflamatórias como a artrite. Dentre estas drogas pode-se incluir o inflixamat (anticorpo anti-TNF- α), etanercept (receptor p75 do TNF- α /proteína de fusão imunoglobulina G) e recentemente adalimumab (anticorpo monoclonal anti-TNF- α). Todas estas terapias anti-TNF- α tem mostrado serem efetivas no tratamento de diferentes doenças que são geralmente associadas com dor (MURRAY & DAHL, 1997; WEINBLATT et al., 1999; HARAOU, 2005).

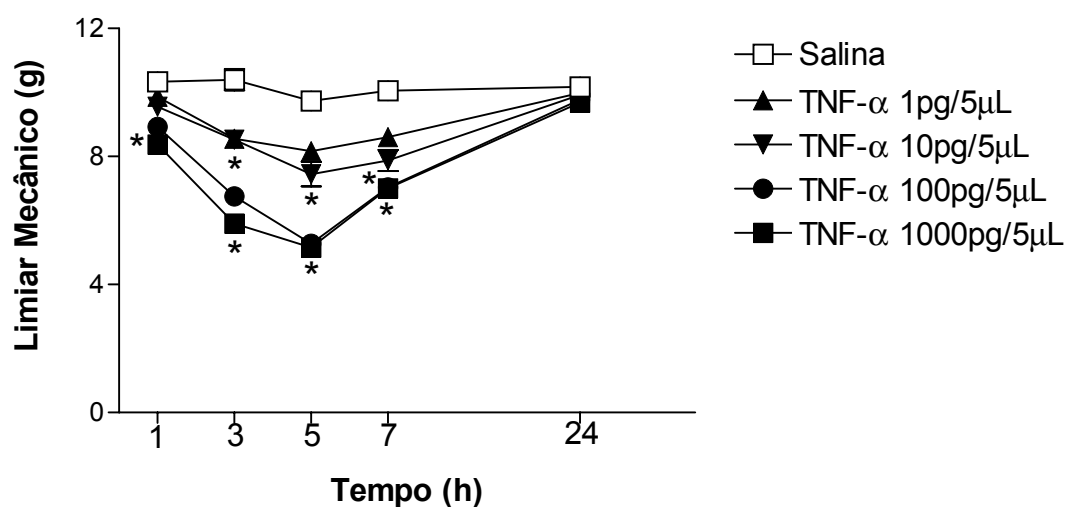


Figura 35 – Hipernociceção inflamatória mecânica articular induzida por TNF- α em camundongos

Curvas dose e tempo resposta de hipernociceção articular induzida pela injeção intra-articular de TNF- α (1, 10, 100, 1000pg/articulação) ou salina (controle). A hipernociceção articular foi avaliada nos tempos de 1-24 hs pelo teste de pressão crescente na pata (painel A). Os resultados são expressos pela média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença significativa comparado com o grupo salina (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

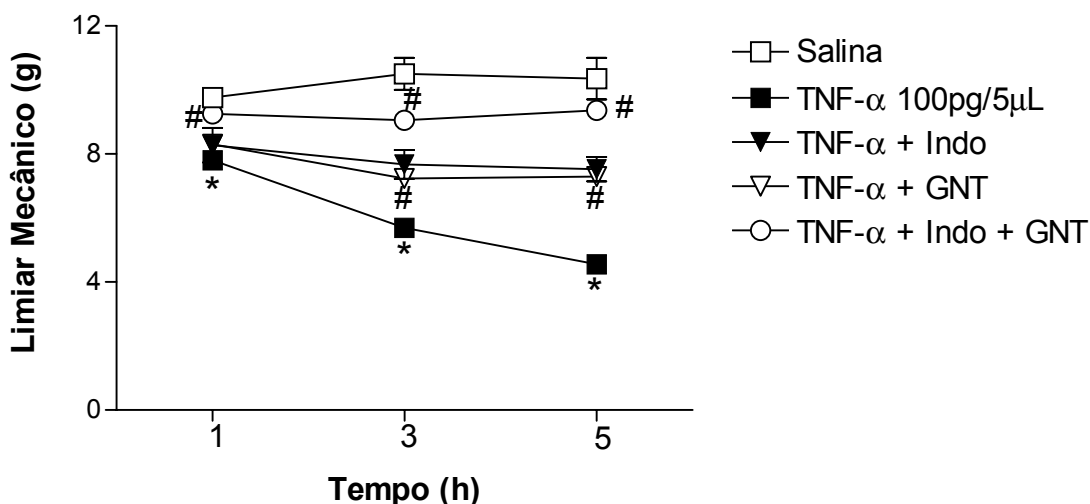


Figura 36 – Participação de prostanóides e aminas simpáticas na resposta hipernociceptiva articular induzida por TNF- α em camundongos

Os animais foram pré-tratados com indometacina (indo-5mg/kg, i.p., 40 minutos), guanetidina (GNT-30mg/kg, s.c. 30 minutos) e indo + GNT (5mg/kg, i.p., 40 minutos, 30mg/kg, s.c. 30 minutos, respectivamente) antes da administração de TNF- α (100pg/5 μ L/articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 1-5 hs pelo teste de pressão crescente na pata. Os resultados são expressos pela média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo TNF- α (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

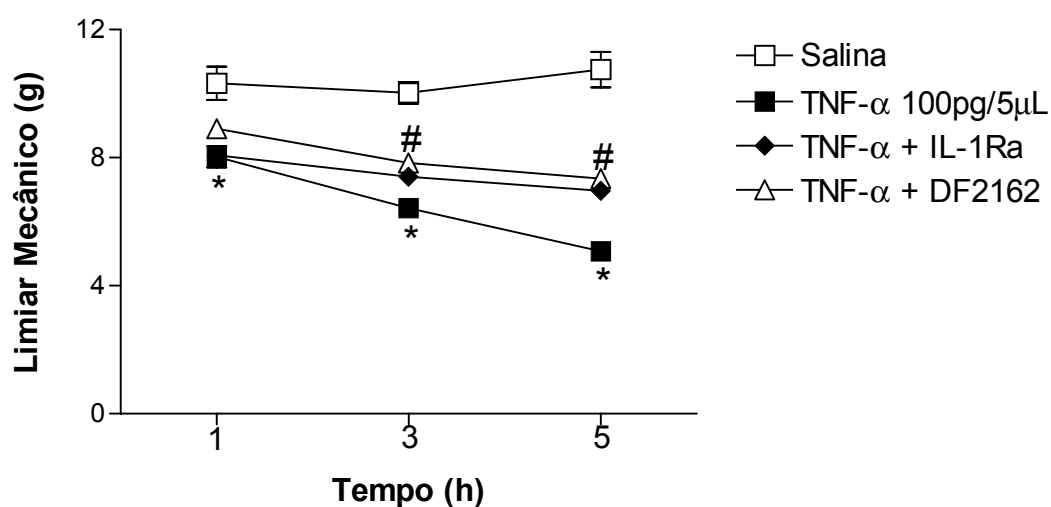


Figura 37 – Participação de IL-1 β e quimiocina KC na resposta hipernociceptiva articular induzida por TNF- α em camundongos

Os animais foram pré-tratados com IL1Ra (30mg/kg, i.v. 15 minutos), DF2162 (15mg/kg, v.o.60 minutos) antes da administração de TNF- α (100pg/5 μ L/articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 1-5 hs pelo teste de pressão crescente na pata. Os resultados são expressos pela média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo TNF- α (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

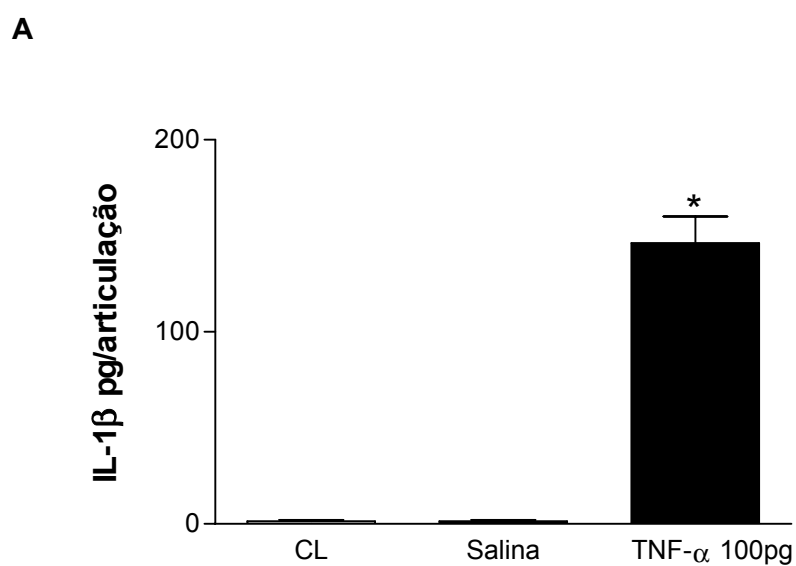


Figura 38A – Efeito da administração i.art. de TNF- α sobre a produção de IL-1 β na articulação de camundongos

Concentração de IL-1 β nas articulações de camundongos injetadas com TNF- α (100pg/5 μ L/articulação), salina ou articulações controle (contra-lateral). Na 5 $^{\circ}$ hora após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem de IL-1 β , a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

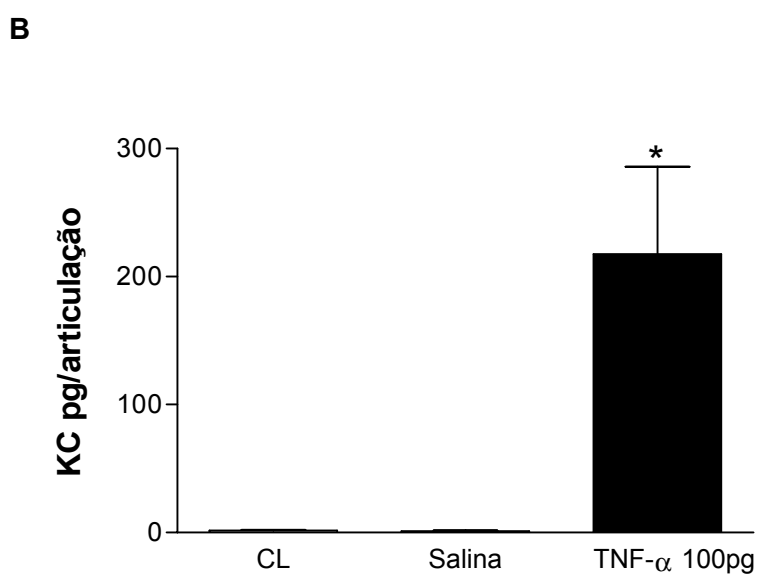


Figura 38B – Efeito da administração i.art. de TNF- α sobre a produção de quimiocina KC na articulação de camundongos

Concentração de KC nas articulações de camundongos injetadas com TNF- α (100pg/5 μ L/articulação), salina ou articulações controle (contra-lateral). Na 5^o hora após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem de KC, a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

4.9 A quimiocina KC induz hipernocicepção mecânica articular em camundongos: papel de TNFR1, IL-1 β , prostaglandinas e aminas simpáticas

A injeção intra-articular da quimiocina KC induziu hipernocicepção mecânica articular de maneira dose (1-100ng) e tempo (1-5) dependentes (Figura 39). A hipernocicepção articular máxima foi observada com a dose de 100ng de KC e a resposta alcançou um plateau entre a 3^a e a 5^a hora após a injeção, retornando aos níveis normais 24 horas após a injeção da mesma.

A hipernocicepção articular induzida pela quimiocina KC (100ng) foi inibida pelo pré-tratamento com indometacina (50%) e guanetidina (58%), ao passo que com a co-administração de indometacina e guanetidina observou-se inibição efetiva (82%) (Figura 40). Ademais, a resposta hipernociceptiva articular foi parcialmente inibida pelo pré-tratamento sistêmico com IL-1Ra (54%) e nos animais TNFR1^{-/-} (44%) (Figura 41).

Estes resultados sugerem que prostaglandinas, aminas simpáticas, IL-1 β e TNF- α estão participando da resposta hipernociceptiva mecânica articular induzido pelo KC em camundongos.

Como o pré-tratamento dos animais com IL-1Ra e a utilização de animais geneticamente modificados para o receptor p55 (TNFR1) do TNF- α apresentaram uma redução da resposta hipernociceptiva mecânica articular induzida pelo KC. O próximo passo foi avaliar se a KC injetada intra-articularmente é capaz de induzir a produção de IL-1 β e TNF- α . Para tal, foram avaliadas as concentrações articulares de IL-1 β e TNF- α após a injeção intra-articular de KC (100ng/5 μ L/articulação) no tempo de 5 horas após a injeção. Pois este tempo corresponde ao tempo de resposta hipernociceptiva articular máxima induzida pelo KC (Figura 39).

As concentrações articulares de IL-1 β e TNF- α foram avaliadas em articulações de animais controle (salina) e grupo estudo (KC 100ng/5 μ L/articulação). As concentrações foram determinadas pelo ensaio de ELISA. Os resultados demonstram um aumento significativo das concentrações de IL-1 β e TNF- α após administração intra-articular de KC quando comparados ao grupo controle (Figura 42A e B).

Muitas quimiocinas apresentam um papel importante nas doenças inflamatórias, por induzir síntese de integrinas, quimiotaxia e angiogênese. Além de modularem a migração leucocitária diretamente, estas podem estimular determinadas células a liberarem citocinas pró-inflamatórias e também metaloproteinasas (MACKAY, 2001). Análise do tecido e fluido sinovial e sangue periférico de pacientes com artrite reumatóide revelaram abundante expressão de quimiocinas e receptores para quimiocinas (HOSAKA et al., 1994; SZEKANECZ et al., 2003). Dentre estas quimiocinas pode ser citado a IL-8 (correspondente a KC em camundongos – BOZIC et al, 1994) que apresenta demonstrações de causar intenso infiltrado de neutrófilos na articulação e destruição da membrana sinovial (ENDO et al., 1991).

Em camundongos o componente simpático da hipernocicepção inflamatória plantar também é estimulado pelas quimiocinas (CUNHA et al., 2005). Neste sentido, Cunha e colaboradores (2005) demonstraram que na hipernocicepção inflamatória plantar em camundongos a quimiocina KC age liberando IL-1 β , mas não é liberada pelo TNF- α . Além disso, a resposta hipernociceptiva induzida pela quimiocina KC foi inibida pelo pré-tratamento com indometacina, sugerindo, portanto, a participação do componente prostaglandínico. No presente trabalho, também foi demonstrado que a quimiocina KC medeia tanto o componente simpático quanto o prostaglandínico. Ademais, a quimiocina KC induz a produção de IL-1 β e TNF- α na articulação. De maneira complementar, a resposta hipernociceptiva mecânica articular induzida pela administração intra-articular de KC foi inibida em animais pré-tratados com IL1Ra e em animais geneticamente modificados para o receptor TNFR1 do TNF- α . Estes resultados sugerem um papel de retroalimentação neste modelo.

Dados da literatura demonstram que a injeção intra-articular de IL-8 estimula a indução de IL-1 (MATSUKAWA et al., 1995). De maneira complementar a injeção de IL-8 intra-articular produziu resposta hipernociceptiva que é prevenida por IL1Ra (DAVIS & PERKINS, 1994). Este dado está de acordo com os dados obtidos no presente trabalho. Um intrigante resultado foi de que a resposta hipernociceptiva induzida pelo KC estava reduzida nos animais geneticamente modificados para o receptor TNFR1 do TNF- α . Podolin e colaboradores (2002) demonstraram que o antagonista de receptores CXCR2 apresentou redução da concentração de TNF- α

no fluido sinovial em um modelo de artrite induzido pela IL-8 em coelhos. Esta indução da expressão de TNF- α por IL-8 pode ser mediada por LTB₄, uma vez que IL-8 induz a produção de LTB₄ (FOGH et al., 1992), sendo que o LTB₄ induz a produção de TNF- α (CANETTI et al., 2001). Esta cascata poderia explicar os resultados obtidos no presente trabalho, uma vez que neste modelo de inflamação articular já foi demonstrada a participação de LTB₄ (GUERRERO et al., 2008). Outra explicação seria que a IL-8 induz a ativação do fator NF- κ B, este fator de transcrição por sua vez media a expressão gênica de TNF- α (YE et al., 1995; COLLART et al., 1990).

Os resultados em conjunto demonstram que ocorre uma liberação de citocinas de maneira retro-alimentativa ou uma inter-regulação destas citocinas neste modelo de inflamação articular.

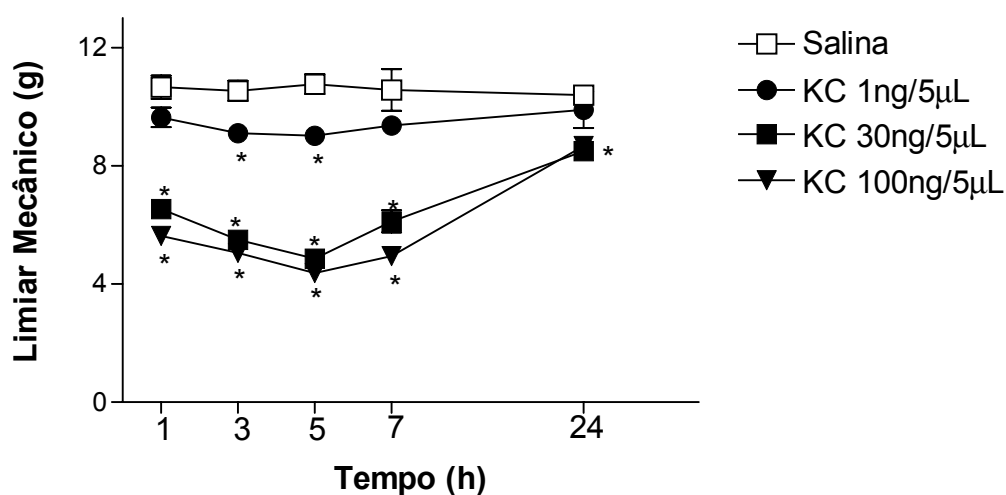


Figura 39 – Hipernocicepção inflamatória mecânica articular induzida por KC em camundongos

Curvas dose e tempo resposta de hipernocicepção articular induzida pela injeção intra-articular de KC (1, 10, 100ng/articulação) ou salina (controle). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 1-24 hs pelo teste de pressão crescente na pata (painel A). Os resultados são expressos pela média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença significativa comparado com o grupo salina (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

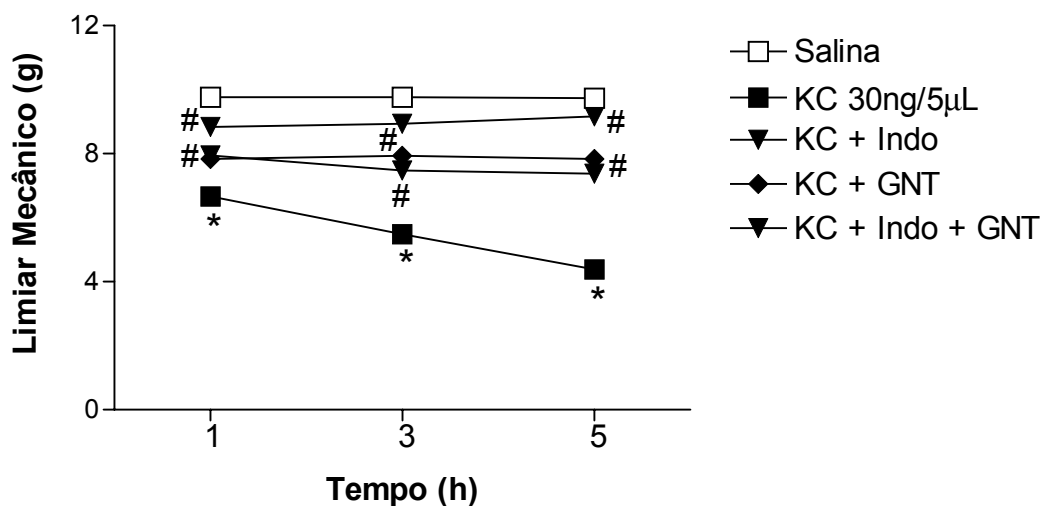


Figura 40 – Participação de prostanóides e aminas simpáticas na resposta hipernociceptiva articular induzida por KC em camundongos

Os animais foram pré-tratados com indometacina (indo-5mg/kg, i.p., 40 minutos), guanetidina (GNT-30mg/kg, s.c. 30 minutos) e indo + GNT (5mg/kg, i.p., 40 minutos, 30mg/kg, s.c. 30 minutos, respectivamente) antes da administração de KC (100ng/5µL/articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 1-5 hs pelo teste de pressão crescente na pata. Os resultados são expressos pela média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # $P < 0,05$ indica diferença significativa comparado com o grupo KC (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

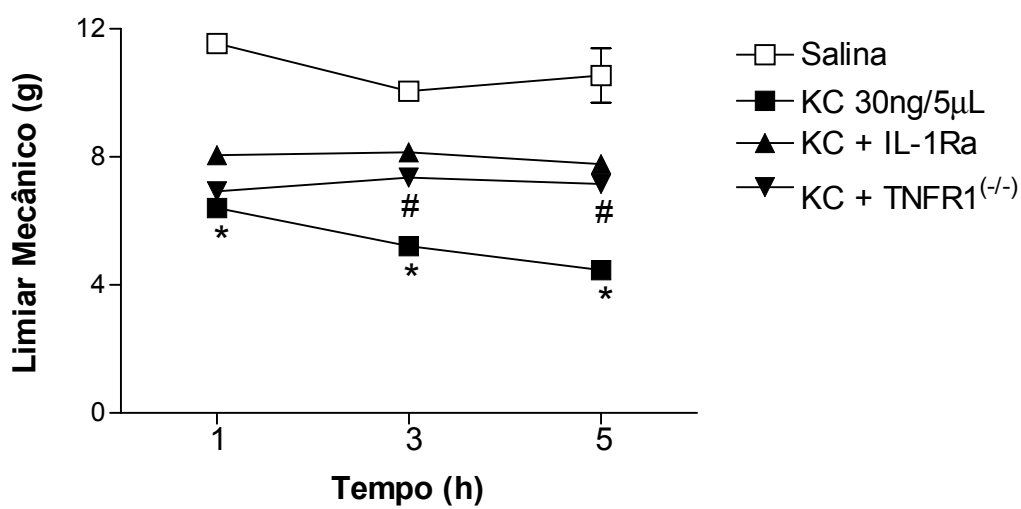


Figura 41 – Participação de IL-1 β e TNFR1 na resposta hipernociceptiva articular induzida por KC em camundongos

Os animais foram pré-tratados com IL1Ra (30mg/kg, i.v. 15 minutos) ou camundongos TNFR1(-/-) receberam injeção i.art. de KC (100ng/5µL/articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 1-5 hs pelo teste de pressão crescente na pata. Os resultados são expressos pela média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo KC (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

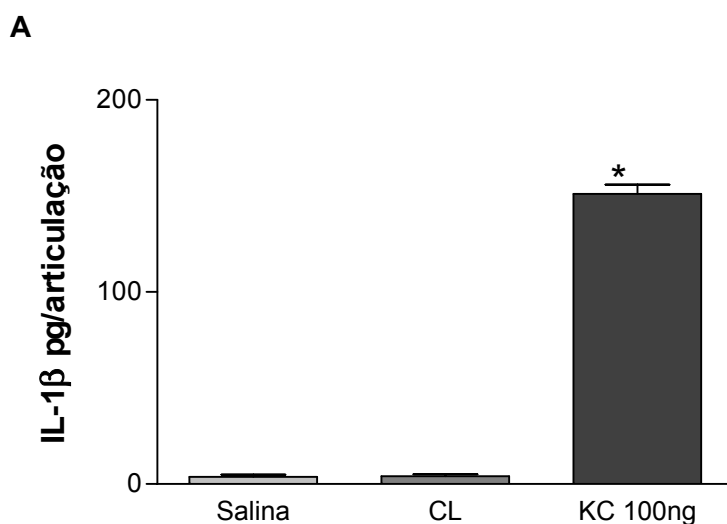


Figura 42A – Efeito da administração i.art. de KC sobre a produção de IL-1 β na articulação de camundongos

Concentração de IL-1 β nas articulações de camundongos injetadas com KC (100ng/5 μ L/articulação), salina ou articulações controle (contra-lateral). Na 5 hora após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem de IL-1 β , a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

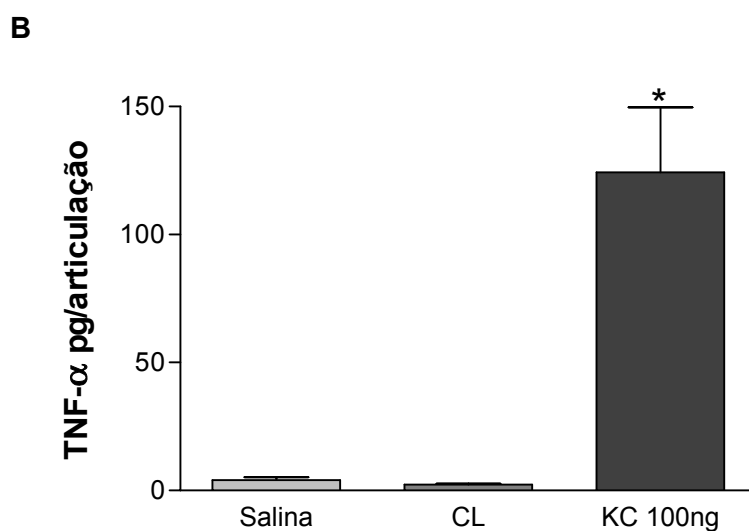


Figura 42B – Efeito da administração i.art. de KC sobre a produção de TNF- α na articulação de camundongos

Concentração de TNF- α nas articulações de camundongos injetadas com KC (100ng/5 μ L/articulação), salina ou articulações controle (contra-lateral). Na 5 hora após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem de TNF- α , a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

4.10 IL-1 β induz hipernocicepção mecânica articular em camundongos: Papel de TNF- α , KC, prostaglandinas e aminas simpáticas

No presente estudo a injeção intra-articular de IL-1 β induziu hipernocicepção mecânica articular de maneira dose (100pg-1-5ng) e tempo (1-5) dependentes (Figura 43). A resposta hipernociceptiva mecânica articular máxima foi observada com a dose de 5ng de IL-1 β e a resposta alcançou um plateau entre a 3^a e a 5^a hora após a injeção, retornando aos níveis normais 24 horas após a injeção da mesma.

A hipernocicepção articular induzida pela citocina IL-1 β (5ng) foi parcialmente inibida pelo pré-tratamento com indometacina (60 %) e guanetidina (56.%) sendo que foi evidenciada inibição efetiva com a co-administração de indometacina e guanetidina (91%) (Figura 44). Ademais, a resposta hipernociceptiva articular foi efetivamente inibida pelo pré-tratamento sistêmico com DF2162 (78%) e parcialmente inibida nos animais TNFR1 $^{-/-}$ (54%) (Figura 45).

Estes resultados sugerem que prostaglandinas, aminas simpáticas, KC e TNF- α estão participando da resposta hipernociceptiva mecânica articular induzida pela IL-1 β em camundongos.

Como o pré-tratamento dos animais com DF2162 e a utilização de animais geneticamente modificados para o receptor P55 (TNFR1) do TNF- α apresentaram uma redução da resposta hipernociceptiva mecânica articular induzida pela IL-1 β . O próximo passo foi avaliar se a citocina IL-1 β injetada intra-articularmente é capaz de induzir a produção de KC e TNF- α . Para tal, foram avaliadas as concentrações articulares de KC e TNF- α após a injeção intra-articular de IL-1 β (5ng/5 μ L/articulação) no tempo de 5 horas após a injeção. Pois este tempo corresponde ao tempo de resposta hipernociceptiva articular máxima induzida pela IL-1 β (Figura 43).

As concentrações articulares de KC e TNF- α foram avaliadas em articulações de animais controle (salina) e grupo estudo (IL-1 β 5ng/5 μ L/articulação). As concentrações foram determinadas pelo ensaio de ELISA. Os resultados

demonstram um aumento significativo das concentrações de KC e TNF- α quando comparados ao grupo controle (Figura 46 Ae B).

A IL-1 β é o protótipo das citocinas inflamatórias plurifuncionais, é um polipeptídeo produzido por uma variedade de células, incluindo macrófagos, fibroblastos, queratinócitos, mastócitos, células da glia e neurônios (BIANCHI et al., 1998). A expressão de aproximadamente 90 genes pode ser afetada pela IL-1, e estes incluem genes para outras citocinas, proteínas de fase aguda, fatores de crescimento, enzimas envolvidas no remodelamento tecidual, componentes da matriz extracelular e moléculas de adesão (O'NEILL, GREENE, 1998). A citocina IL-1 β é encontrada em altos níveis no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide. Esta citocina liberada nas articulações inflamadas pode alterar o processo normal de turnover da cartilagem. Pois tal citocina pode estimular os sinoviócitos e os condrócitos a liberarem metaloproteinases e outras proteinases que resultam na degradação da cartilagem. A IL-1 β também pode ativar osteoclastos conduzindo a erosão do osso subcondral (FLESCHER et al., 1990). Além disso, os níveis de IL-1 β no fluido sinovial têm sido correlacionados com dor e hiperalgesia em pacientes com artrose da articulação temporomandibular (ALSTERGREN et al., 1998).

A primeira demonstração do efeito hipernociceptivo da IL-1 foi evidenciada por nosso grupo (FERREIRA et al., 1988) e desde então, seu envolvimento na hipernocicepção inflamatória tem sido descrito por diferentes autores (OKA et al., 1993, SUNG, 2004). Ferreira (1988), demonstrou que administração de um anticorpo contra IL-1 β e de antagonistas de IL-1R1, IL-1Ra ou K(D)PT, um tripeptídeo desenvolvido a partir da sequência de aminoácidos da IL-1 β , foi capaz de inibir a hipernocicepção mecânica induzida pela Cg ou LPS (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1992; CUNHA et al., 2000). Recentemente nosso grupo também demonstrou que IL-1 β é capaz de induzir hipernocicepção plantar mecânica dose e tempo dependente em camundongos (CUNHA et al., 2005).

Levando-se em consideração os resultados acima mencionados, foi investigada a participação de IL-1 β na hipernocicepção articular mecânica em camundongos. A importância da citocina IL-1 β na fisiopatologia da artrite foi demonstrada uma vez que a injeção de IL-1 na articulação de coelhos causou

severa artrite (PETTIPHER et al., 1986). Por outro lado, a injeção de anticorpo anti IL-1 e IL-1Ra apresentou melhora no curso da doença (VAN DEN BERG et al., 1994; JOOSTEN et al., 1996; MAKAROV et al., 1996). A injeção intra-articular de IL-1 β causou resposta hipernociceptiva articular dose tempo dependente que foi parcialmente inibida pelo pré-tratamento sistêmico com indometacina, guanetidina e associação destas. Estes achados estão de acordo com prévios dados da literatura que demonstram que a IL-1 estimula condrócitos e sinoviócitos a liberarem prostaglandina E2 (DAYER et al., 1986). Isto pode explicar o achado no presente trabalho de que o tratamento com indometacina reduziu a resposta hipernociceptiva articular induzida pela administração intra-articular de IL-1 β . Sugerindo, portanto, a participação de prostaglandinas na resposta hipernociceptiva articular induzida pela IL-1 β .

Além disso, no presente trabalho foi demonstrado que animais injetados intra-articularmente com IL-1 β apresentaram redução da resposta hipernociceptiva articular quando foram pré-tratados com DF2162 (antagonista CXCR1 e CXCR2). Ademais, IL-1 β injetada intra-articularmente nos animais geneticamente modificado para o receptor TNFR1 do TNF- α apresentaram também redução da resposta hipernociceptiva articular induzida pela IL-1 β quando comparados com os animais selvagens. Estes resultados sugerem a participação de TNF- α agindo em receptores TNFR1 e quimiocina KC na resposta hipernociceptiva articular induzida pela IL1 β .

Diferentemente do que acontece na resposta hipernociceptiva plantar em camundongos em que IL-1 β não apresentou redução da resposta hipernociceptiva plantar em animais pré-tratados com anticorpo anti KC ou em animais deficientes para o receptor TNFR1 do TNF- α , demonstrando que neste modelo a IL-1 β é liberada após TNF- α e KC, indicando a liberação sequencial destas citocinas.

No entanto, no presente modelo de inflamação intra-articular foi observado que a resposta hipernociceptiva articular induzida pela IL-1 β é inibida pelo pré-tratamento com DF2162 e em animais deficientes do receptor TNFR1, sugerindo, portanto, que neste modelo estas citocinas estão agindo de maneira retro-alimentativa. Corroborando a estes achados, no presente trabalho foi demonstrado que a injeção intra-articular de IL-1 β induziu a produção de TNF- α e quimiocina KC.

Dados da literatura demonstram que a citocina IL-1 β estimula a produção de IL-8 (correspondente a KC em camundongos) através de um aumento na expressão de genes da IL-8 em células sinoviais, o qual parece estar associado ao aumento do infiltrado inflamatório na membrana sinovial de pacientes com desordem temporomandibular (TOBE et al., 2002). Além disso, o efeito da IL-1 β na produção de outras citocinas inflamatórias também foi demonstrado. Neste sentido, Aida (2006) demonstrou que condrócitos estimulados por IL-1 β apresentaram aumento da expressão de receptores para IL-8 e TNF- α . Além disso, foi demonstrado que a adição de IL-1Ra reduziu a expressão de IL-8 e TNF- α , sugerindo, portanto, que a IL-1 β pode interferir na produção de outras citocinas inflamatórias pelos condrócitos.

Portanto, TNF- α , IL-1 β e KC constituem uma ligação entre os estímulos inflamatórios (zimosan e LPS) e a liberação de prostaglandinas e aminas simpáticas, as quais sensibilizam diretamente o nociceptor. Além disso, parece que estas citocinas medeiam a hipernocicepção inflamatória articular mecânica em camundongos agindo retro-alimentativamente ou que exista uma inter-regulação destas citocinas.

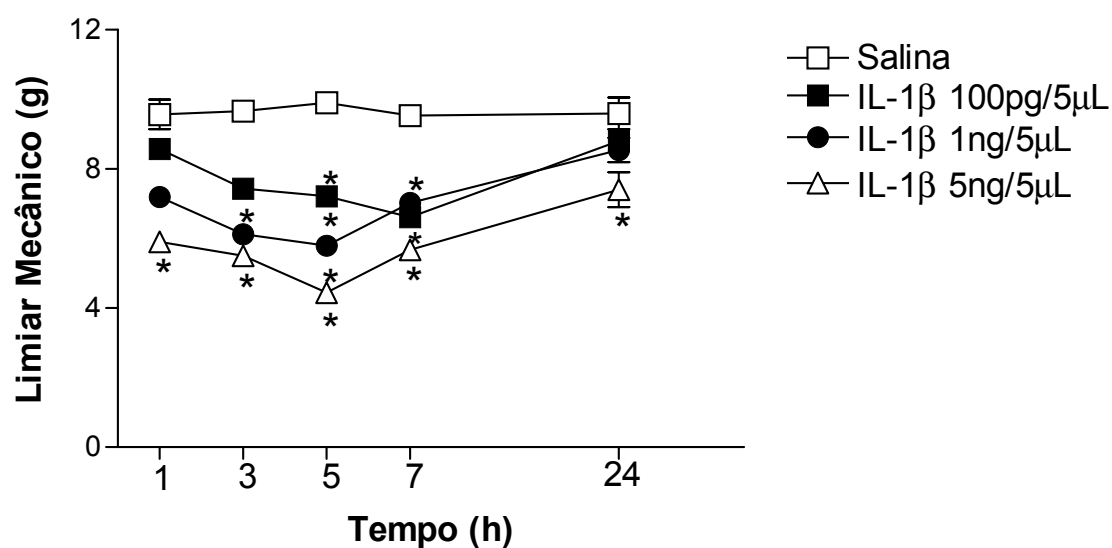


Figura 43 – Hipernocicepção inflamatória mecânica articular induzida por IL-1 β em camundongos

Curvas dose e tempo resposta de hipernocicepção articular induzida pela injeção intra-articular de IL-1 β (100, 1000, 5000pg/articulação) ou salina (controle). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 1-24 hs pelo teste de pressão crescente na pata (painel A). Os resultados são expressos pela média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença significativa comparado com o grupo salina (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

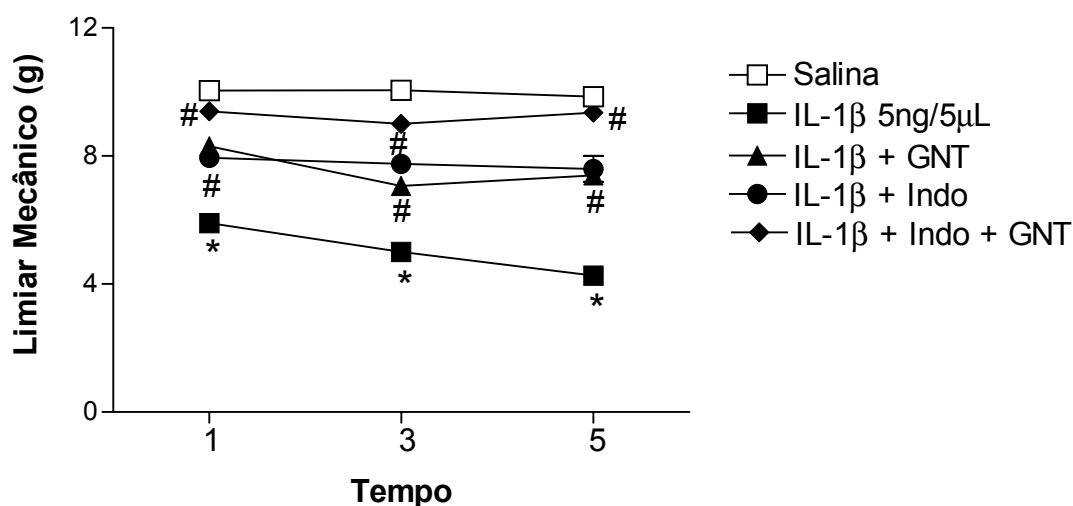


Figura 44 – Participação de prostanóides e aminas simpáticas na resposta hipernociceptiva articular induzida por IL-1 β em camundongos

Os animais foram pré-tratados com indometacina (indo-5mg/kg, i.p., 40 minutos), guanetidina (GNT-30mg/kg, s.c. 30 minutos) e indo + GNT (5mg/kg, i.p., 40 minutos, 30mg/kg, s.c. 30 minutos, respectivamente) antes da administração de IL-1 β (5000pg/5 μ L/articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 1-5 hs pelo teste de pressão crescente na pata. Os resultados são expressos pela média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo KC (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

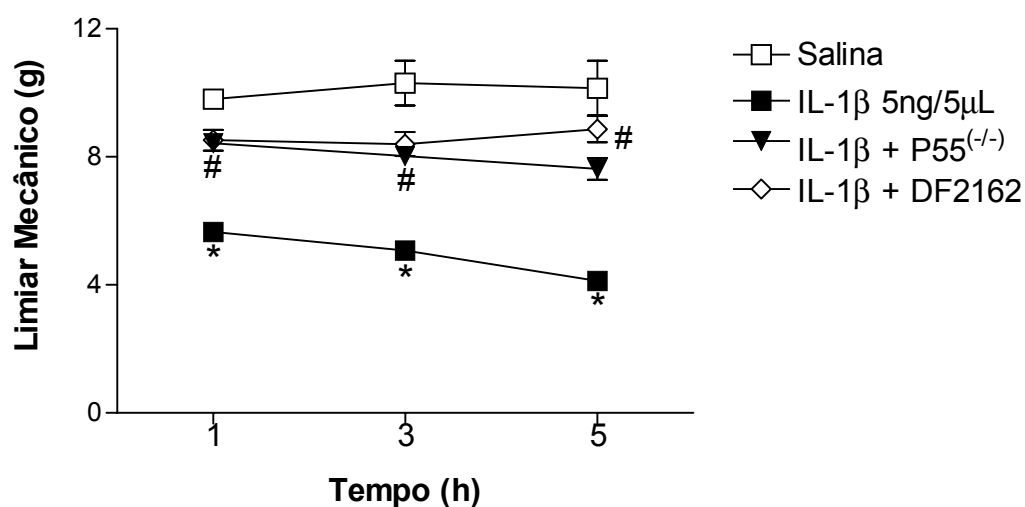


Figura 45 – Participação de KC e TNFR1 na resposta hipernociceptiva articular induzida por IL-1 β em camundongos

Os animais foram pré-tratados com DF2162 (15mg/kg, v.o.60 minutos) ou camundongos TNFR1(-/-) receberam injeção i.art. de IL-1 β (5000pg/5 μ L/articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 1-5 hs pelo teste de pressão crescente na pata. Os resultados são expressos pela média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo IL-1 β (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

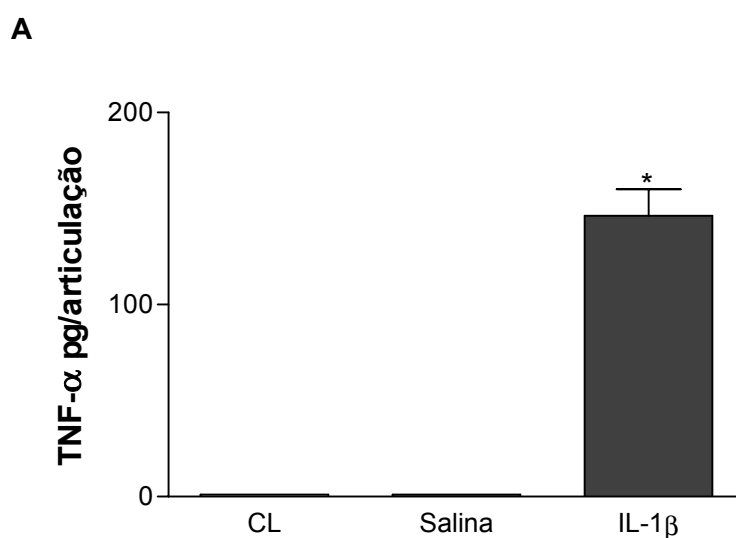


Figura 46A – Efeito da administração i.art. de IL-1 β sobre a produção de TNF- α na articulação de camundongos

Concentração de TNF- α nas articulações de camundongos injetadas com IL-1 β (5000pg/5 μ L/articulação), salina ou articulações controle (contra-lateral). Na 5 hora após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem de TNF- α , a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

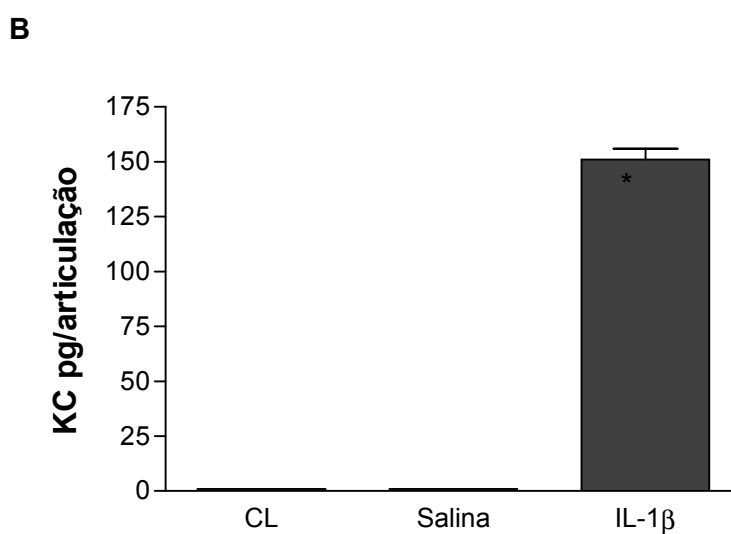


Figura 46B – Efeito da administração i.art. de IL-1 β sobre a produção de IL-1 β na articulação de camundongos

Concentração de KC nas articulações de camundongos injetadas com IL-1 β (5000pg/5 μ L/articulação), salina ou articulações controle (contra-lateral). Na 5 hora após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem de KC, a qual foi determinada por ELISA. As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

4.11 A administração intra-articular de TNF- α , IL-1 β e KC induz migração neutrofílica articular e hipernocicepção mecânica articular que são inibidas pela fucoidina

Com o objetivo de se avaliar a participação da migração de neutrófilos articular induzida pela administração intra-articular de TNF- α , IL-1 β e KC utilizou-se o método colorimétrico cinético para determinar a atividade da mieloperoxidase (MPO) (BRADLEY et al., 1982). A mieloperoxidase é uma enzima presente nos grânulos primários dos neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos (BORREGAARD & COWLAND, 1997).

Pelo ensaio da mieloperoxidase (MPO) foi observado que o número de neutrófilos que migrou para o tecido articular no período de 5 horas após a injeção intra-articular de TNF- α (100pg/5 μ L), IL-1 β (5pg/5 μ L) e KC (30ng/5 μ L) foi significativamente diferente quando comparado ao grupo controle (salina) e articulação contra-lateral (Figura 47). Portanto, TNF- α , IL-1 β e KC causaram aumento da migração de neutrófilos para o tecido articular.

O próximo passo foi avaliar a relação entre hipernocicepção articular e migração leucocitária articular induzidas pelas citocinas e quimiocina acima mencionadas. Para tal, foi realizado o pré-tratamento com fucoidina uma droga que se liga a L-selectina inibindo o rolamento de neutrófilos (NASU et al., 1997) (20mg/kg,i.v.) 15 minutos antes da administração intra-articular de TNF- α , IL-1 β e KC (injetadas separadamente). Os animais que receberam injeção intra-articular de quimiocina KC (100ng/5 μ L/articulação) e foram pré-tratados com fucoidina apresentaram tanto redução da resposta hipernociceptiva articular na 5^a hora (82%), (Figura 48A), quanto redução da migração neutrofílica articular também na 5^a hora (62%) (Figura 48A). Também foi observada redução da resposta hipernociceptiva articular (70%) (Figura 49A) e da migração de neutrófilos (60%) (Figura 49B) induzidas pela citocina TNF- α (100pg/5 μ L/articulação) após tratamento com fucoidina. De maneira complementar a injeção intra-articular da citocina IL-1 β (5pg/5 μ L/articulação) induziu resposta hipernociceptiva articular que foi inibida pelo pré-tratamento com fucoidina (63%) (Figura 50A) e redução da migração neutrofílica articular (58%) (Figura 50B).

Os dados demonstram que a inibição da resposta hipernociceptiva mecânica articular é acompanhada da redução da migração de neutrófilos para o

tecido articular induzidas pela injeção intra-articular das citocinas TNF- α e IL- β e quimiocina KC. Portanto, os resultados sugerem que existe relação de dependência entre a hipernocicepção mecânica articular e migração de neutrófilos para o tecido articular induzidas por tais citocinas e quimiocina.

Os neutrófilos são as células mais abundantes nas articulações de pacientes com artrite reumatóide ativa, estima-se que cerca de 90% das células presentes no fluido sinovial correspondam a neutrófilos (EDWARDS, et al., 1997). Dados da literatura demonstram que os neutrófilos parecem ter papel fundamental nas manifestações articulares da artrite. Neste sentido, neutrófilos têm sido identificados na junção *pannus*-cartilagem tanto em modelos experimentais, como no tecido sinovial de pacientes com artrite (KITSIS e WEISMANN, 1991; WESSINGHAGE, 1978; MOHR et al., 1986).

Adicionalmente, estudos demonstraram que a participação dos polimorfonucleares do fluido sinovial no dano da cartilagem deve-se, em parte, à capacidade destas células de liberarem mediadores inflamatórios como citocinas pró-inflamatórias, proteases, metaloproteases e espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, os quais contribuem para a lesão tecidual observada na artrite (BURKHARDT, et al., 1986; HARRIS, 1990; HAMPTON et al., 1998). Ainda, segundo Mitani et al., (2001), a ocorrência de processos de ativação, fagocitose e morte celular de neutrófilos *in situ*, acarretam o acúmulo de produtos potencialmente lesivos no fluido sinovial, os quais também contribuem para o dano à cartilagem.

Dados da literatura demonstram que a injeção intra-articular de IL-8 (correspondente a KC em camundongos) induziu intenso acúmulo de neutrófilos na articulação, demonstrando o papel quimioatraente desta quimiocina (MATSUKAWA et al., 1995). Além disso, dados da literatura demonstram que TNF- α e IL- β são capazes de induzirem o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório (WANKOWICZ et al., 1988).

Além disso, Levine e colaboradores (1984) demonstrou que a resposta hipernociceptiva induzida por LTB₄ é abolida através da depleção de leucócitos (LEVINE et al., 1984). Ademais, recentemente foi demonstrado pelo nosso grupo que neste modelo de hipernocicepção articular a resposta hipernociceptiva articular produzida pelo LTB₄ é também dependente de neutrófilos (GUERRERO et al., 2008). Além do mais neste modelo parece existir relação de dependência entre resposta

hipernociceptiva articular e migração leucocitária articular. Pois o pico hipernociceptivo articular corresponde ao pico de migração leucocitária articular (GUERRERO et al., 2006). Além disso, o pré-tratamento dos animais com fucoidina inibe a resposta hipernociceptiva articular induzida por zimosan e também inibe a migração leucocitária articular (GUERRERO et al, 2008).

De maneira complementar a estes resultados, foi demonstrado que a fucoidina inibe a resposta hipernociceptiva mecânica plantar induzida pela carragenina. Porém não inibe a resposta hipernociceptiva plantar causada por PGE₂ e dopamina, pois tal resposta não é dependente de neutrófilos. Também foi demonstrado que a resposta hipernociceptiva mecânica plantar induzida por TNF- α , IL- β e CINC-1 é inibida pela fucoidina, sugerindo, portanto que os neutrófilos estão envolvidos na produção de mediadores hipernociceptivos de ação direta (CUNHA et al; 2008). Além disso, nosso grupo demonstrou que a resposta hipernociceptiva plantar induzida pelo C5a é dependente de neutrófilos, pois a depleção de neutrófilos resultou em diminuição da resposta hipernociceptiva. Importante salientar que no mesmo trabalho foi demonstrado que a resposta hipernociceptiva induzida pelo C5a é independente da liberação de citocinas (TING et al., 2008). Estes resultados confirmam o papel relevante dos neutrófilos na resposta hipernociceptiva.

Os dados da literatura sobre uma ação anti ou pró-nociceptiva dos neutrófilos são controversos. Pois, Brack (2004) demonstrou que neutrófilos produzem opióides. E que, portanto, estes neutrófilos contribuiriam para uma resposta antinociceptiva. É provável que estes neutrófilos apresentem uma ação pró-nociceptiva uma vez que estes liberam mediadores inflamatórios que podem propiciar uma resposta hipernociceptiva. Dados da literatura demonstram a participação de radicais livres na hipernocicepção inflamatória (WANG et al., 2004). Este dado é interessante uma vez que a enzima mieloperoxidase, presente nos neutrófilos, produz radicais livres.

É sabido que TNF- α , IL1- β e quimiocina KC apresentam atividade quimiotática para neutrófilos. Portanto, estas substâncias poderiam estar atraindo neutrófilos para a articulação e estes por sua vez liberariam substâncias que potencializariam os efeitos hipernociceptivos destas. Recentemente, Cunha e Verri (2006) discutiram sobre essa ação anti-nociceptiva ou pró-nociceptiva dos neutrófilos. Estes autores sugerem que o papel dos neutrófilos na gênese da

hipernocicepção é dependente do tipo e intensidade de estímulo e também dos diferentes estágios da inflamação.

Finalizando, no presente trabalho estes neutrófilos parecem apresentar um papel pró-nociceptivo, pois a utilização de fucoidina uma ferramenta farmacológica que inibe o rolamento dos neutrófilos resultou em redução da resposta hipernociceptiva induzida pelas citocinas TNF- α e IL-1 β e quimiocina KC injetadas intra-articularmente. Portanto, mediante estes resultados pode-se sugerir que o bloqueio da migração de neutrófilos pode ser uma importante estratégia para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas.

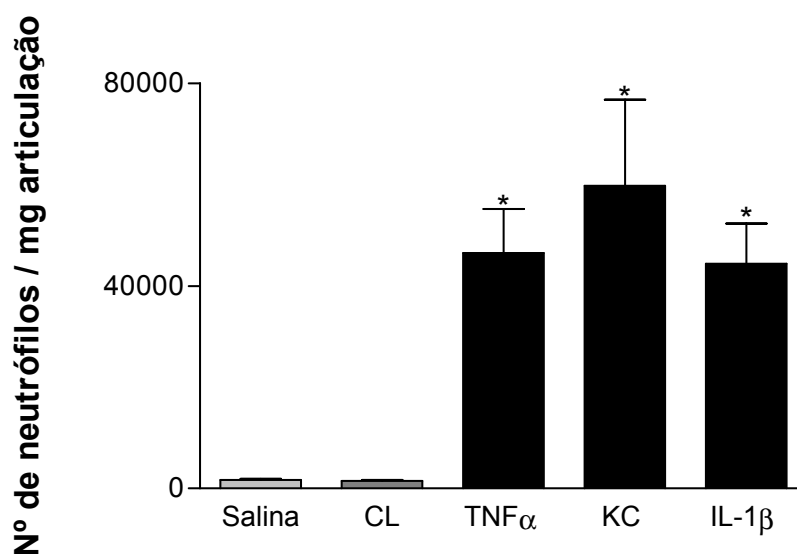


Figura 47 - Administração i.art. de TNF- α , IL-1 β e KC induz migração leucocitária articular em camundongos

Efeito de TNF- α , IL-1 β e KC (100pg, 5ng e 30ng/5 μ L/articulação, respectivamente) na migração leucocitária articular. Na 5^o hora após a injeção os animais foram sacrificados e amostras de articulação foram extraídas para dosagem da atividade da mieloperoxidase a qual foi determinada por MPO. As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo controle.

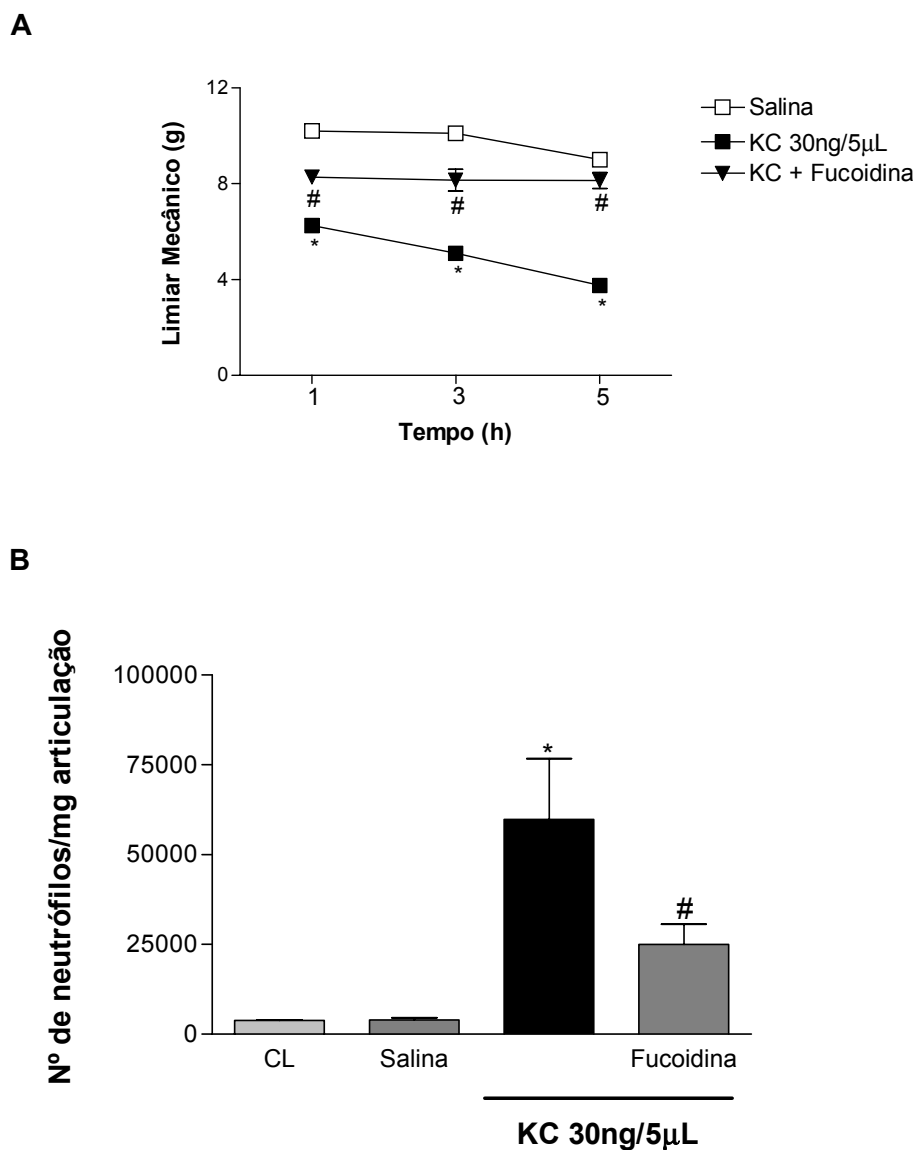


Figura 48 – Efeito da fucoïdina na resposta hipernociceptiva articular e na migração leucocitária articular induzidas pelo KC em camundongos

Os animais foram pré-tratados com fucoïdina (20mg/kg, i.v., 15 minutos) antes da administração de KC (100ng/5µL/articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 0-5 hs pelo teste de pressão crescente na pata (painel A) e migração leucocitária para o tecido articular avaliada no tempo de 5 hs pelo ensaio de atividade da mieloperoxidase (painel B). As barras representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # P<0,05 diferença significativa entre KC e o grupo tratado (fucoïdina) (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

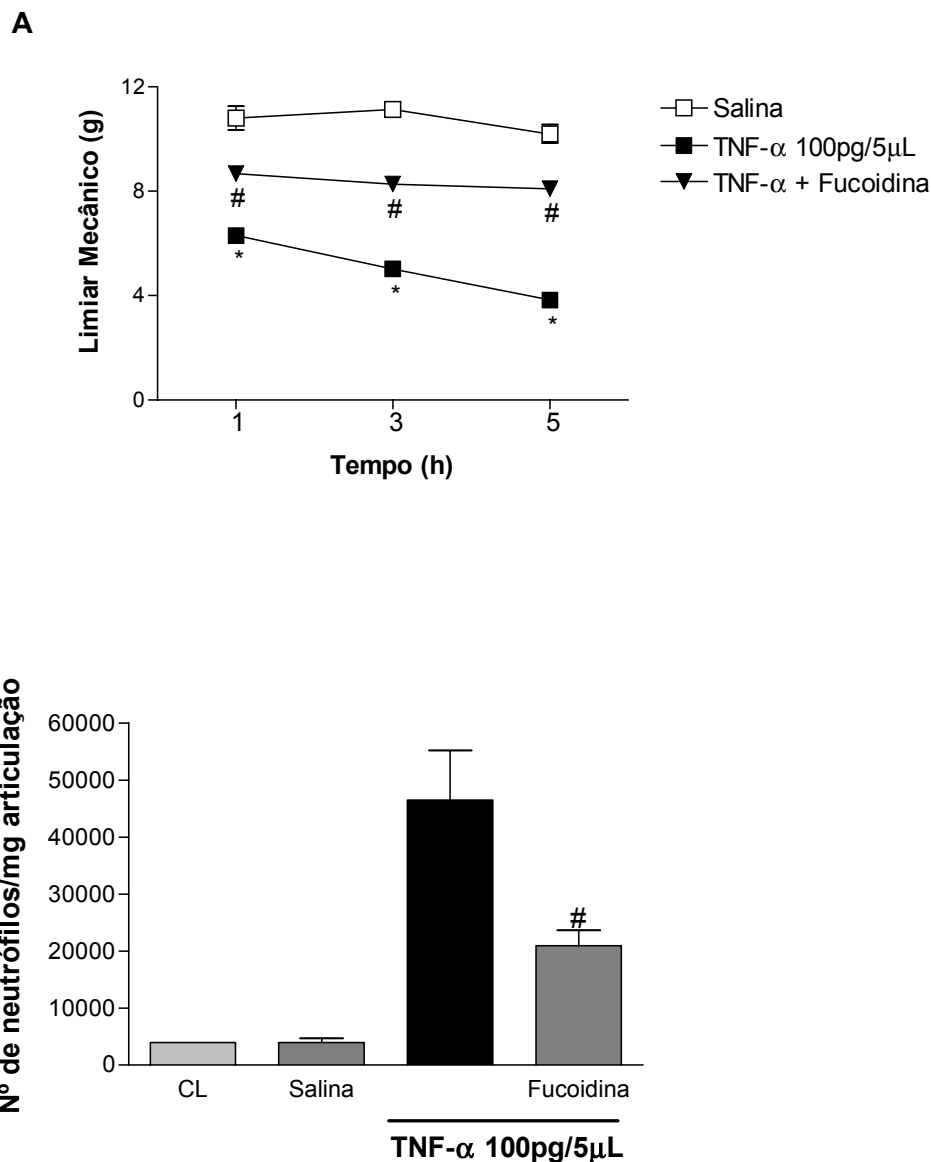
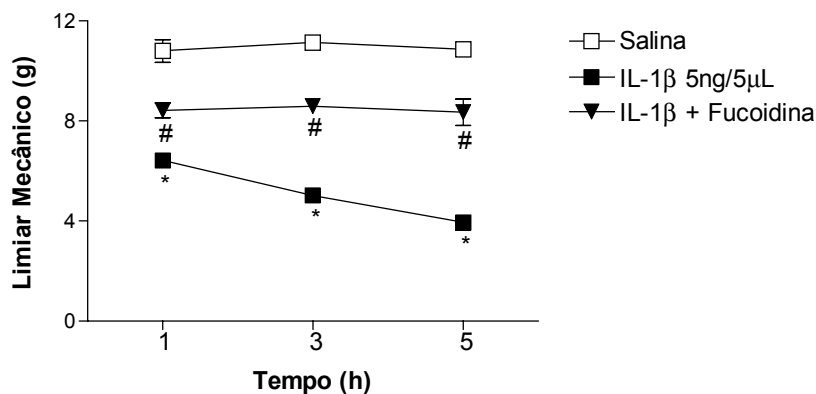


Figura 49 – Efeito da fucoidina na resposta hipernociceptiva articular e na migração leucocitária articular induzidas pelo TNF- α em camundongos

Os animais foram pré-tratados com fucoidina (20mg/kg, i.v., 15 minutos) antes da administração de TNF- α (100pg/5 μ L/articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 0-5 hs pelo teste de pressão crescente na pata (painel A) e migração leucocitária para o tecido articular avaliada no tempo de 5 hs pelo ensaio de atividade da mieloperoxidase (painel B). As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. *P<0,05 indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # P<0,05 diferença significativa entre TNF- α e o grupo tratado (fucoidina) (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

A



B

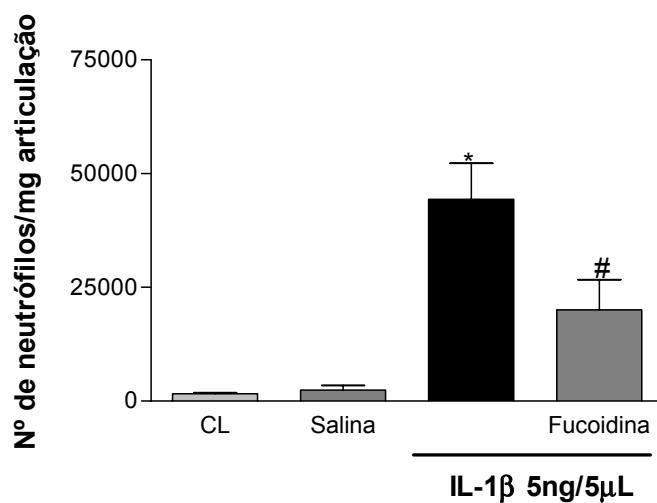


Figura 50 – Efeito da fucoidina na resposta hipernociceptiva articular e na migração leucocitária articular induzidas pela IL-1β em camundongos

Os animais foram pré-tratados com fucoidina (20mg/kg, i.v., 15 minutos) antes da administração de IL-1β (5ng/5μL/articulação). A hipernocicepção articular foi avaliada nos tempos de 0-5 hs pelo teste de pressão crescente na pata (painel A) e migração leucocitária para o tecido articular avaliada no tempo de 5 hs pelo ensaio de atividade da mieloperoxidase (painel B). As barras representam a média \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença significativa comparado com o grupo salina e # $P < 0,05$ diferença significativa entre IL-1β e o grupo tratado (fucoidina) (ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

Conclusões

5 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo são compatíveis com a hipótese que TNF- α , IL-1 β e quimiocina KC participam da resposta hipernociceptiva articular e da migração neutrofílica articular no modelo de inflamação articular induzido por agonista Toll-like 2 (zimosan) e Toll-like 4 (LPS). O agonista Toll-like 2 induz resposta hipernociceptiva articular e migração neutrofílica articular dependentes de receptores Toll-like 2 que sinaliza via molécula MyD88. Já o agonista Toll-like 4 induz resposta hipernociceptiva articular e migração de neutrófilos dependentes de receptores Toll-like 4 que sinaliza via molécula MyD88 e MAL/TIRAP. Estes agonistas Toll-like injetados intra-articular induzem a produção de TNF- α , IL-1 β e quimiocina KC na articulação. A produção de TNF- α , IL-1 β e quimiocina KC mediada pelo zimosan é dependente apenas de MyD88. Enquanto a produção destas citocinas e quimiocina pelo LPS é dependente tanto de MyD88 quanto de MAL/TIRAP e independente de TRIF. Estas citocinas e quimiocinas injetadas intra-articularmente induzem resposta hipernociceptiva articular que é mediada por prostanóides e aminas simpáticas. Na resposta hipernociceptiva articular TNF- α , IL-1 β e quimiocina KC estão agindo de maneira retro-alimentativa. Além disso, os resultados demonstram uma relação de dependência entre os fenômenos de hipernocicepção articular e migração de neutrófilos para o tecido articular induzidas pela administração intra-articular das citocinas e quimiocina acima mencionadas. Essas conclusões estão resumidas na figura 51. Estes resultados sugerem novas perspectivas como a utilização de antagonistas dos receptores do tipo Toll (2 e 4) para o controle da dor inflamatória articular ou mesmo da inibição dos mecanismos resultantes da ativação destes receptores.

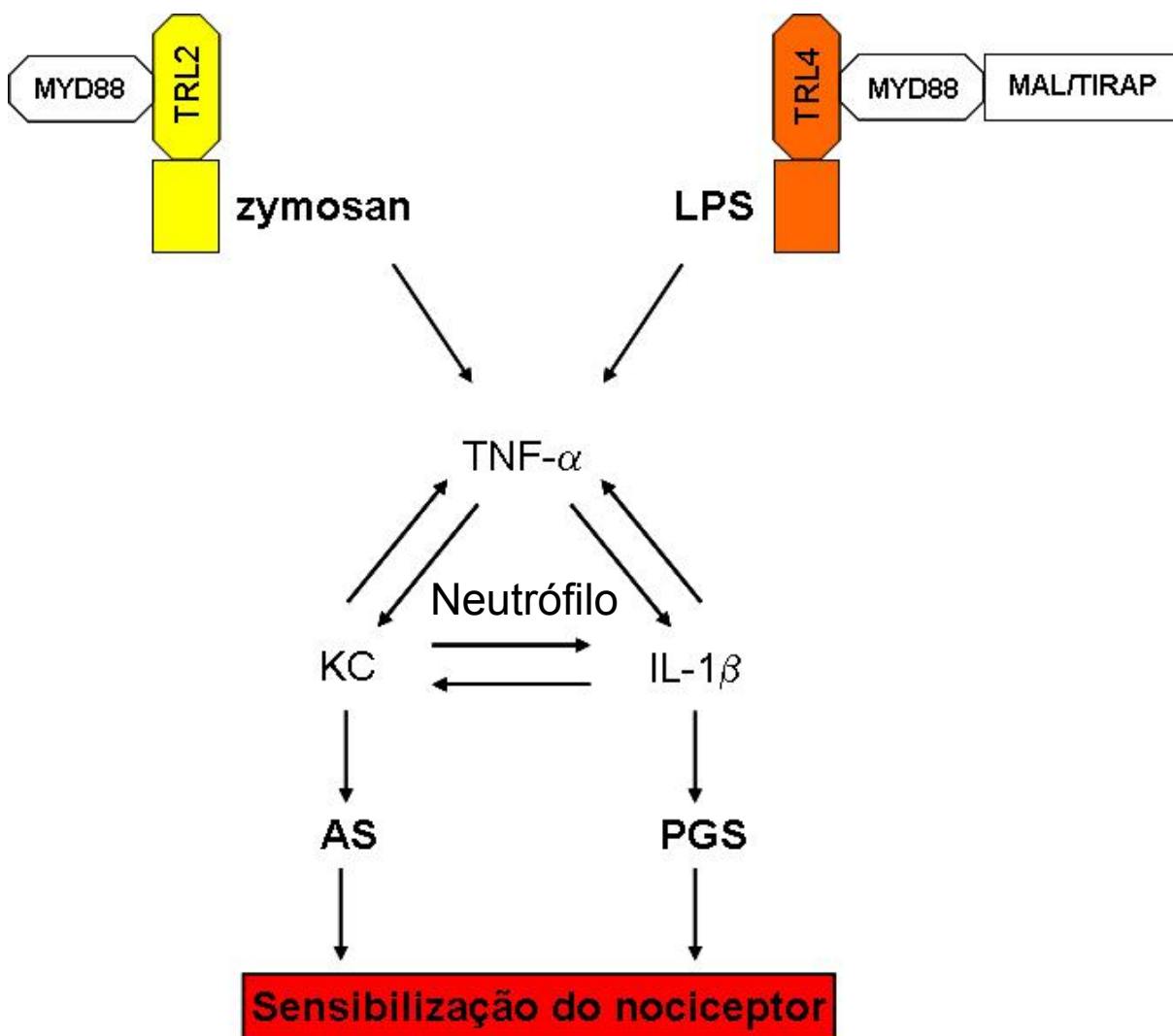


Figura 51 – Diagrama representativo da inter-regulação de citocinas que medeia a resposta hipernociceptiva articular e a migração neutrofílica articular em camundongos neste modelo de inflamação articular

A figura mostra a inter-regulação dos mediadores inflamatórios iniciado pelo zimosan agindo via molécula MyD88 e receptores Toll-like 2, ou LPS agindo vai moléculas MyD88, MAL/TIRAP e receptores Toll-like 4 intermediado pelas citocinas, com a liberação final de prostaglandinas (PGs) e aminas simpáticas (AS).

Referências Bibliográficas

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHI-ROODSAZ S, et al., Inhibition of Toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis **Arthritis & Rheumatism**, v.56, p.2957-2967, 2007.

ADACHI O., et al.. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-18-mediated function. **Immunity**, v.4, p.499-511, 1998.

ADEREM A, UNDERHILL DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu Rev Immunol**. Review. v.17, p. 593-623, 1999

AIDA, Y., MAENO, M., SUZUKI, N., et al., The effect of IL-1 β on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in human chondrocytes. **Life Science**, v. 79, p. 764-771, 2006.

AKIRA, S., TAKEDA, K., KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat. Immunol**. v.2, p. 675–680, 2001

ALSTERGREN, P., ERNBERG, M., et al., Interleukin-1beta in synovial fluid from the arthritic temporomandibular joint and its relation to pain, mobility, and anterior open bite. **J. Oral Maxillofac Surg**, v.56, p.1059, 1998.

ALSTERGREN, P., KOPP, S., Insufficient endogenous control of tumor necrosis factor- α contributes to temporomandibular joint pain and tissue destruction in rheumatoid arthritis. **J. of Rheumatology**, v.33, p. 1734-39, 2006.

AREND W. P., DAYER G.M., Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v.38, p. 151-60, 1995.

ARMSTRONG, D.; et al. Pain producing substance in human inflammatory exudates and plasma. **J. Physiol**. V. 135, p. 350-370, 1957

BARKSBY HE., et al., the expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. **Clinical Experim Immunol**, v.149, p.217-25, 2007.

BELLAVITE, P. The superoxide-forming enzyme system of phagocytes. **Free Radical Biol. Med.** v.4, p. 225-261, 1988.

BENNETT, G. AL-RASHED JRS, HOULT SD, BRAIN Nerve growth factor induced hyperalgesia in the rat hind paw is dependent on circulating neutrophils. **Pain.** v. 77, p. 315-322, 1998.

BERTOLINI D. R, NEDWIN GE, BRINGMAN T. S, SMITH D. D, MUNDY G. R. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. **Nature.** 1986 v. 319, p. 516-8.

BERTORELLI, R.; CORRADINI, L.; RAFIQ, K.; TUPPER. J.; CALO, G.; ONGINI, E. Nociceptin and the ORL-1 ligand [Phe¹psi (CH₂-NH) Gly²] nociceptin (1-13) NH₂ exert anti-opioid effects in the Freund's adjuvant-induced arthritic rat model of chronic pain. **Br. J. Pharmacol.** v. 128, p. 1252-1258, 1999.

BEUTLER, B; Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling. **Nature**, v. 430, p. 257-63, 2004.

BHOOLA, K. D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. **Pharmacol. Rev.** V. 44, p. 1-80, 1992.

BIANCHI, M., DIB, B., PANERAI, A.E., Interleukin-1 and nociception in the rat. **Jr. Neuroscience Ressearch**, v.56, p.645-650, 1998.

BISGAARD H, KRISTENSEN J. K. Leukotriene B₄ produces hyperalgesia in humans. **Prostaglandins.** 1985 v.30, p:791-7.

BOMBINI, G., et. al., Tumour necrosis factor-alpha mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. **Eur J Pharmacol.**, v.496, p.197-204, 2004.

BONNEY, R. J.; et al. Regulation of prostaglandins synthesis and the selective release of lysosomal hydrolases by mouse peritoneal macrophages. **Biochemical J.** v. 176, p. 433-442, 1978

BORREGAARD, N & COWLAND, J.B., Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v.89, p. 3503-3521, 1997.

BOZIC, C.R., GERARD, N.P., et al., The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. Expression and biological characterization. **J. biol. Chem.** v. 269, p. 29355-29358, 1994.

BRACK, A., RITTNER, H.L., et al., Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. **Pain**, v.112, p.229-238, 2004

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, v. 78, p. 206-209, 1982.

BRANDÃO, M. L. Dor. Em: BRANDÃO, M. L (ed.), **Psicofisiologia: As bases fisiológicas do comportamento**. 8º ed. São Paulo, editora Atheneu, 2002, p. 151-269.

BRENNAN, F.M., CHANTRY, D., JACKSON, A., MAINI, R.N., FELDMANN, M., Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 2, p. 244-247, 1989.

BRESSAN E et al., Contribution of TNF- α , IL-1 β and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis **Cytokine**, v.36, p.83-89, 2006.

BRINDER, R.; KRESS, A.; KIRSCHFINK, M. Modulation of C5a-mediated effector functions of human polymorphonuclear leukocytes by tumor necrosis factor alpha and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **Exp. Clin. Immunogenet.** V.16, p. 212-225, 1999.

BRODIE MJ, HENSBY CN, PARKE A, GORDON D. Is prostacyclin in the major pro-inflammatory prostanoid in joint fluid? **Life Sci.** v. 27, p. 603-608, 1980.

BROWN GD, TAYLOR PR, REID DM, WILLMENT JA, WILLIAMS DL, MARTINEZ-POMARES L, WONG SY, GORDON S. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. **J Exp Med.** 2002 v:196, p. 407-512.

BRUNE, K. **The concept of inflammatory mediators. Discoveries in Pharmacology, Haemodynamics, Hormones & Inflammation.** Parnham M. J. & Bruinvels J. Elsevier Science Publishers, B. V. v. 2, p. 487-498, 1984

BURGESS GM, PERKINS MN, RANG HP, CAMPBELL EA, BROWN MC, MCINTYRE P, URBAN L, DZIADULEWICZ EK, RITCHIE TJ, HALLETT A, SNELL CR, WRIGGLESWORTH R, LEE W, DAVIS C, PHAGOO SB, DAVIS AJ, PHILLIPS E, DRAKE GS, HUGHES GA, DUNSTAN A, BLOOMFIELD GC. Bradyzide, a potent non-peptide B(2) bradykinin receptor antagonist with long-lasting oral activity in animal models of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.** v. 129, p. 77-86, 2000.

BURKE-GAFFNEY, A. & HELLEWELL, P.G., Tumour necrosis factor-alpha-induced ICAM-1 expression in human vascular endothelial and lung epithelial cells: modulation by tyrosine kinase inhibitors. **Br. J. Pharmacol.** v. 119, p. 1149, 1996.

BURKHARDT, H., SCHWINGEL, M., MENNINGER, H., MACARTNEY, H., e TSCHESCHE, H. Oxygen radicals as effectors of cartilage destruction. Direct degradative effect on matrix components and indirect action via activation of latent collagenase from polymorphonuclear leukocytes. **Arthritis Rheum.** 1986 v.29, p:379-87.

BURKHARDT, H., SCHWINGEL, M., MENNINGER, H., MACARTNEY, H., e TSCHESCHE, H. Oxygen radicals as effectors of cartilage destruction. **Arthritis Rheum.** v. 29, p. 379-87, 1986.

BURNS K, et al., Inhibition of interleukin 1 receptor/ Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. **J. Exp. Med.** v.197, p.263-68, 2003.

BUTLER SH, GODEFROY F, BESSON JM, WEIL-FUGAZZA J. A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. **Pain.**; v.48, p:73-81, 1992.

CAMPOS, M. M.; SOUZA, G. E. P.; CALIXTO, J. B. In vivo B₁ kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor κ B pathways. **Br. J. Pharmacol.** v. 127, p. 1851-1859, 1999.

CANETTI, C, SILVA, J. S, FERREIRA, S.H, CUNHA, F.Q., Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **Br. J. Pharmacol.** v.134, p.1619-628, 2001.

CANNETTI CA., et al., IL-18 enhances collagen-induced arthritis by recruiting neutrophils via TNF-alpha and leukotriene B4 **J Immunol**, v. 171, p. 1009-1015, 2003.

CANNETTI, Claudio A. **Estudo dos mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos induzida por antígeno e pela IL-18**. Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), 2002.

CAO, Z., et al., TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. **Nature**. v. 383, p. 443-6. 1996.

CASADIO, R., et al., Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1beta/IL-1R(I) complex. **FEBS Lett**. v. 15, p. 65-8. 2001.

CHENOWETH, D. E.; et al. Human C5a-related synthetic peptides as neutrophil chemotactic factors. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, V. 86(2), p. 227-234, 1979

CHEN C-J et al., MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. **J. Clin. Invest**, v.116, p.2262-71, 2006

CHOE JY, CRAIN B, WU SR, CORR M. Interleukin 1 receptor dependence of serum transferred arthritis can be circumvented by toll-like receptor 4 signaling. **J Exp Med**. v:197, p:537-42, 2003

CHU, C.Q., et al., Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**. v.34, p.1125-32, 1991.

CLAESSON HE, LUNDBERG U, MALMSTEN C. Serum-coated zymosan stimulates the synthesis of leukotriene B4 in human polymorphonuclear leukocytes. Inhibition by cyclic AMP. **Biochem Biophys Res Commun**. v.30, p.1230-7, 1981.

CLANCY, R.M., DAHINDEN, C.A., HUGLI, T.E. complement-mediated arachidonate metabolism. **Prog. Biochem. Pharmacol**. V.20, p.120-31, 1985.

CLARCK-LEWIS, I., et al. Structure-activity relationships of interleukin-8 determines using chemically synthesized analogs. Critical role of NH2-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. **J Biol Chem**, v. 266; p. 23128-34; 1991.

CLARK, D.J., et al. Blockade of the complement C5a receptor reduces incisional allodynia, edema and cytokine expression. **Anesthesiology**, v.104, p.1274-82, 2006.

COELHO, F. M., et al., The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. **Arthritis Rheum.** v.58, p.2329-37, 2008.

COLLART, M.A., et al., Regulation of tumor necrosis factor α transcription in macrophages: involvement of four κ B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF- κ B. **Mol. Cell.Biol**, v.10, p1498, 1990

COOK C. D.; NICKERSON M. D. Nociceptive Sensitivity and Opioid Antinociception and Antihyperalgesia in Freund's Adjuvant-Induced Arthritic Male and Female Rats. **Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics.** v. 313(1), p. 449-459, 2005.

CORSINI, E., GALLI, C.L., Cytokines and irritant contact dermatitis. **Toxicology Letters**, v. 102, p. 277-282, 1998.

CUNHA JM, et al., cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. *Br J Pharmacol*, v.130, p.1418-1424, 2000.

CUNHA TM, VERRI JR WA, VIVANCOS GG, MOREIRA IF, REIS S, PARADA CA, CUNHA FQ, FERREIRA SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res.** v.37, p. 401-7, 2004.

CUNHA TM, VERRI WA JR, SILVA JS, POOLE S, CUNHA FQ, FERREIRA SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **PNAS.** v. 102, p.1755-1760, 2005.

CUNHA, F. Q. ; FERREIRA, S. H. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: Inhibition by glucocorticoids. **Eur. J. Pharmacology.** V. 129, p. 65-76, 1986.

CUNHA, F.Q., et al. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.** v. 107, p. 660-664, 1992.

CUNHA, F.Q., LORENZETTI, B.B., POOLE, S. and FERREIRA, S.F., Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br. J Pharmacol**, v.104, p. 765-767, 1991.

CUNHA, F.Q.; et al.. The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacology**. V. 107, p. 660-664, 1992

CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems-cyclic AMP and cyclic GMP on inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v.127, p. 671-678, 1999.

CUNHA, T.M. **Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, p. 102, 2005.

CUNHA, T.M., VERRI, W.A.Jr., Neutrophils: are they hyperalgesic or anti-hyperalgesic ? **J. leukocyte Biology**, v.80, p.727-28, 2006

CUNHA, T.M., et al., Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice. **Br. J. Pharmacol.** v. 154, p. 460-70, 2008.

CUTHBERT, A.W.; MARGOLIUS, H.S. Kinins stimulate net chloride secretion by the rat colon. **Br. J. Pharmacol.** v. 75, p. 587-598, 1982.

CUZZOCREA S., et al. Role of glucocorticoid-induced TNF receptor family gene (GITR) in collagen-induced arthritis. **Faseb J**, v.19; p. 1253-65; 2005.

D'CRUZ D, HUGHES G. Rheumatoid Arthritis: The clinical features. **J Musculoskel Med.** v.10, p.85-93, 1993.

DA ROCHA FA, ARAGAO AG JR, OLIVEIRA RC, POMPEU MM, VALE MR, RIBEIRO RA. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflammation Research.** v. 48, p. 485-490, 1999..

DALLOB A, GUINDON Y, GOLDENBERG, M.M., Pharmacological evidence for role of lipoxygenase products in platelet-activating factor (PAF)-induced hyperalgesia. **Biochem Pharmacol.** v. 36, p. 3201-3204, 1987.

DAVIDSON EM, RAE SA, SMITH MJ. Leukotriene B4, a mediator of inflammation present in synovial fluid in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**. v.42, p. 677-9, 1983

DAVIS A.J. & PERKINS M.N The involvement of bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical inflammatory hyperalgesia in the rat. v.113, p: 63-68, 1994.

DAYER JM, BEUTLER B, CERAMI A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. **J Exp Med**. 1985 v.162, p: 2163-8.

DAYER,J.M., de ROCHAMONTEIX, B., BURRUS, B., DEMCZUK, S., DINARELLO, C.A. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. **J.Clin Invest** , v.77,p.645-648, 1986.

DE-MELO JD, TONUSSI CR, D'ORLEANS-JUSTE P, RAE GA. Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naive and previously inflamed knee-joints in the rat: inhibition by endothelin receptor antagonists. **Pain**. v. 77, p.261-269, 1998.

DI CARLO, F. J.; FIORE, J. V. On the composition of zymosan. **Science**, v. 127, p. 756-757, 1958.

DINARELLO, C. A. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of septic shock syndrome. **J. Infect. Dis**. v. 163, p. 1177-1184, 1991.

DINARELLO, C. A.; et al. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. **J. Exp. Med**. V. 163, p. 1443-1450, 1986.

DINCHUK JE, CAR BD, FOCHT RJ, JOHNSTON JJ, JAFFEE BD, COVINGTON MB, CONTEL NR, ENG VM, COLLINS RJ, CZERNIAK PM, et al. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. **Nature**. v. 23; p.406-9, 1995.

DJEU, J.Y., SERBOUSEK, D., BLANCHARD, D.K., Release of tumour necrosis factor by human polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, v.76, p. 1405-1409, 1990.

DOHERTY, NS.; POUBELLE, P.; BERGEAT, P.; BEAVER, TH.; WESTRICH, GL.; SCHRADER, NL. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 30, p :769-789, 1985.

DONALDSON LF, SECKL JR, MCQUEEN DS. A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effects of adjuvant dose. **J. Neurosci. Methods**. v. 49, 5-10, 1993.

DOYLE, S., VAIDYA, S., O'CONNELL, R., DADGOSTAR, H., DEMPSEY, P., WU, T.,RAO, G., SUN, R., HABERLAND, M., MODLIN, R., CHENG, G. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* v.17, p. 251–263, 2002

DUNNE A., O'NEILL, L.A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. **Sci. STKE** v. 3, p.171, 2003.

DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci**. V.16, p.99-104, 1993.

DUARTE, I. D. G.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participatiuonj of sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res**. v. 21, p. 341-343, 1988.

EASTGATE J.A., et al., Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. **Lancet**, v.ii, p. 706-9, 1988.

EDWARDS SW, WATSON F, GASMI L, MOULDING DA, QUAYLE JA. Activation of human neutrophils by soluble immune complexes: role of Fc gamma RII and Fc gamma RIIIb in stimulation of the respiratory burst and elevation of intracellular Ca²⁺. **Ann N Y Acad Sci**. 1997 v. 15, p: 341-57.

ELLIOTT, M.J. et al., Repeated therapy with monoclonal-antibody to tumor-necrosis-factor-alpha (Ca₂) in patients with rheumatoid-arthritis. **Lancet**, v.344, p.1125-27, 1994.

ELSNER, J., PETERING, H. et al. Human eotaxin represents a potent activator of the respiratory burst of human eosinophils. **Eur J Immunol**, v. 26; p. 1919-25; 1996.

ENDO, H., AKAHOSHI, T., et al., Elevation of interleukin-8 (IL-8) levels in joint fluids of patients with rheumatoid arthritis and the induction by IL-8 of leukocyte infiltration and synovites in rabbits joint. **Lymphokine Cytokine Res.** v. 10, p. 245-252, 1991.

FACCIOLI, L. H.; et al. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration 'in vivo' by indirect mechanisms. **Agents Actions.** v. 30, p. 344-349, 1990.

FAIRES, S.J.; MCCARTY, J.D. Acute arthritis in man and dogs after intrasynovial injection of sodium urate crystals. **The Lancet.** v. 11, , p. 682-684. 1962.

FELDMANN, M., BRENNAN, F.M., MAINI, R.N., Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annual Review of Immunology**, v. 14, p. 397-440, 1996.

FELDMANN, M., et al., Rheumatoid arthritis **Cell** v.85, p. 307-10, 1996.

FENG, C.G., et al., Mice lacking myeloid differentiation factor 88 display profound defects in host resistance and immune responses to *Mycobacterium avium* infection not exhibited by Toll-Like receptor-2 (TRL-2) and TRL4-deficient animals. **J Immunology** , p. 4578-64,2003.

FERREIRA SH, ROMITELLI M, DE NUCCI G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J Cardiovasc Pharmacol.**; v.13, Suppl 5:S220-2, 1989.

FERREIRA, S. H. Are macrophages the body's allarme cells? **Agents and Actions.** v. 10, p. 227-230, 1980.

FERREIRA, S. H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nature.** v. 240, p. 200-203. 1972.

FERREIRA, S. H. Prostaglandins: peripheral and central analgesia. **Advances in pain inflammatory research and therapy.** v. 5, p. 627-634. 1983.

FERREIRA, S. H.; DUARTE, I. D. G.; LORENZETTI, B. B. Molecular base of acetylcholine and morphine analgesia. In: M. J. Parnham, M.A. Bray and W.B. Van de Berg (Eds.) **Drugs in Inflammation.** v. 32, Birkhauser, 1991, p. 101-106.

FERREIRA, S. H.; et al. Interleukin-1 β as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**. v. 334, p. 698-700. 1988.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; CORREA, F. M. A. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs, **Eur. J. Pharmacology**. v. 53, p. 39-48. 1978b.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; de CAMPOS, D.I., Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. **Pain**. v. 42, p. 365-371. 1990.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokines mediated inflammatory hyperalgesia, **Br. J. Pharmacology**. v. 110, p. 1227-1231. 1993.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M. I prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandins**. v. 18, p. 179-190, 1979a.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M.; CASTRO, M. S. A. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandins E₂. **Prostaglandins**. v. 16, p. 31-37. 1978a.

FERREIRA, S.F., LORENZETTI, B.B., BRISTOW, A.F., and POOLE, S., Interleukin-1 β as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v.334, p. 698-700, 1988.

FERREIRA, S.H., et al. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**. v. 334, p. 698-700, 1988.

FERRELL WR, NADE S, NEWBOLD PJ. The interrelation of neural discharge, intra-articular pressure, and joint angle in the knee of the dog. **J. Physiol**. v. 373, 353-365. 1986.

FIGARELLA-BRANGER, D., CIVATE, M., et al. Cytokines, chemokines and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. **Muscle Nerve**, v. 28; p. 659-82, 2003.

FIRESTEIN GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**. Review. v. 423, p. 356-61. 2003.

FITZGERALD KA. Et al., IKK ϵ and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. **Nat. Immunol**, v.4, p.491-496, 2003.

FLESCHER, E., GARRETT, I.R., et al., Induction of bone resorbing activity by normal and rheumatoid arthritis T cells. **Clin. Immunol immunopathol**, v.56, p.210-218, 1990

FLÓREZ, J. Dolor: mecanismos de transmission y control. **Terapéutica Farmacológica del dolor**. Madrid, p. 19-39. 1993

FOGH K, LARSEN CG, IVERSEN L, KRAGBALLE K. Interleukin-8 stimulates the formation of 15-hydroxy-eicosatetraenoic acid by human neutrophils in vitro. **Agents Actions**. 1992 v.35, p: 227-31

FORD-HUTCHINSON, A. W. M.; BRAY, M. V.; DOIG, M. E.; SHIPLEY, M. J. H.; SMITH. Leukotriene B₄ a potent chemotactic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. **Nature**. v. 286, p. 264-265. 1980.

FRASER, G. L.; GAUDREAU, G. A.; CLARKE, P. B.; MENARD, D. P.; PERKINS, M. N. Antihyperalgesic effects of delta opioid agonists in a rat model of chronic inflammation. **Br. J. Pharmacol**. v. 129(8), 2000, p. 1668-1672.

FREY, V. Untersuchungen über die sinnesfunctionen der menschlichen haut. **Abhandl. Sachs. Ges. Wiss.**, v. 23, 1896, p. 175-266.

FRICKE, D.; DAMERAU, B.; VOGT, W. Adhesion of Guinea Pig polymorphonuclear leukocytes to autologous aortic strips: Influence as chemotactic factors and of pharmacological agents which affect arachidonic acid metabolism. **Int. Archs. Allergy Appl. Immunol**. v. 78, 1985, p. 429-437.

FUJISAWA, H., WANG, B.H., KONDO, S., SHIVJI, G.M., SAUDER, D.N., Costimulation with ultraviolet B and interleukin-1 alpha dramatically increase tumor necrosis factor-alpha production in human dermal fibroblasts. **Jr. of Interferon and Cytokine Research**, v.17, p. 307-313, 1997.

FURST, D.E., et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody, and concomitant standard antirheumatic therapy for the treatment of rheumatoid arthritis: results of STAR (safety trial of adalimumab in rheumatoid arthritis). **J. of Rheumatol**, v. 30, p. 2563-71, 2003.

GAO, J. X. AND ISSEKUTZ, A. C. The effect of ebselen on polymorphonuclear leukocyte migration to joints in rats with adjuvant arthritis. **Int. J. Immunopharmac.** Vol. 15, p. 793-802. 1993.

GARNERO P, DELMAS PD. Biomarkers in osteoarthritis. **Curr Opin Rheumatol.** Review v. 15, p. 641-6. 2003.

GASQUE, P., et al. Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactiva astrocytes, microglia and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. **Am. J. Pathol.** V.150, p.31-41, 1997.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; CHIEVRIER, D.; GUNGAMP, C.; TERLAIN, B.; NETTER, P. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life Science.** v. 55, p. 321-326. 1994.

GERARD, N.P., GERARD, C. C5a anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. **Annu. Rev. Immunol.** V.12, p.775-808, 1994.

GERARD, N.P., GERARD, C. The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. **Nature**, v.349, p.614-17, 1991.

GOETZL, E. J.; PICKETT, W. C. The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs). **J. Immunol.** v. 125, p. 1789-1791. 1980.

GOULDING NJ. Corticosteroids- A case of mistaken identity? **Brit. J. Rheumatol.** v. 37, p. 477-483. 1998.

GRACIE JA, et al., a proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest.** 1999 v.104, p.1393-1401.

GRANT, E.P., et al. Essential role for the C5a receptor in regulation the effector phase of synovial infiltration and joint destruction in experimental arthritis. **J. Exp.Med.** v.196, p.1461-71, 2002.

GUERRERO, A.T., et al., Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. **Pharmacol Biochem Behav.** V. 84, p. 244-51, 2006.

GUERRERO, A. T., et al., Involvement of LTB4 in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE2. **J. Leukoc. Biol** v. 83, p.122-30, 2008

GUREGE, O.; VAN KOFF, M.; SIMON, G.; GATEN, R. Persistent pain and well being – a World Health Organization Study in Primary Care. **JAMA**. v. 280, p. 147-151. 1998.

GURSEL T, FIRAT S, ERCAN ZS. Increased serum leukotriene B4 level in the active stage of rheumatoid arthritis in children. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v.56, p.205-7. 1997.

GUYTON, A. C. Negative pressures in knee joints. **Nature**. V. 212, p. 1046, 1966.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **BooL**. v. 92, 1998, p. 300-317.

HANESCH U, HEPPELMANN B, SCHMIDT RF. Neurokinin A-like immunoreactivity in articular afferents of the cat. **Brain Res**. v.24, 1992, p. 332-5.

HANNINGTON-KIFF, F.G. Intravenous regional sympathetic block with guanethidine. *Lancet*, V. 25, 1974 (1(7865)), p. 1019-1020.

HARAOUI, B. The anti-tumor necrosis factor agents are a major advance in the treatment of rheumatoid arthritis. **J Rheumatol Suppl**, v. 72, p: 46-47, 2005.

HARKNESS, R. A. The characteristic cell of acute inflammation. The polymorphonuclear neutrophil leucocyte, and its biochemistry. **Molec. Aspects Med.**, v. 3, 1981, p. 191-207.

HARRIS, R. R. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. **N. Eng. J. Med**. v. 322, 1990, p.1277-1289.

HASHIMOTO C, et al., The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. **Cell**, v. 52, p. 269-279, 1988.

HASLETT, C; SAVILL, J. S.; WHYTE, M. K.; STERN, M.; DRANSFIELD, I.; MEAGHER, L. C. Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. **Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.** v. 345, 1994, p. 327-333.

HENDERSON, B, et al., Inhibition of interleukin-1-induced synovitis and articular cartilage proteoglycan loss in the rabbit knee by recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. **Cytokine.** v. 3, p. 246-249, 1991.

HENSLEY, K., et al. Message and protein-level elevation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and TNF-alpha – modulation cytokines in spinal cords of the G93A-SOD-1 mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. **Neurobiol Dis**, v. 14; p. 74-80; 2003.

HEUMANN, D., et al., Contribution of TNF/TNF receptor and of Fas ligand to toxicity in murine models of endotoxemia and bacterial peritonitis. **J. Inflamm.** v.47, p.173-9, 1995.

HIGGS GA, MONCADA S, SALMON JA, SEAGER K. The source of thromboxane and prostaglandins in experimental inflammation. **Br J Pharmacol.** v.79, 1983, p. 863-8.

HINGTGEN, C.M.; WAITE, K.J.; VASKO, M.R. Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3, 5,-cyclic monophosphate transduction cascade. **J. Neurosci.**, v.15, 1995, p. 5411-5419.

HOLLINGSWORTH, J.W., SIEGEL, E.R., CREASEY, W.A. Granulocyte survival in synovial exudate of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory joint diseases. **Yale J. Biol. Med.** v. 39, 1967, p. 289-96.

HORAI R, NAKAJIMA A, HABIRO K, KOTANI M, NAKAE S, MATSUKI T, NAMBU A, SAIJO S, KOTAKI H, SUDO K, OKAHARA A, TANIOKA H, IKUSE T, ISHII N, SCHWARTZBERG PL, ABE R, IWAKURA Y. TNF-alpha is crucial for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. **J Clin Invest.** 2004 v.114, p:1603-11.

HORAI R, SAIJO S, TANIOKA H, NAKAE S, SUDO K, OKAHARA A, IKUSE T, ASANO M, IWAKURA Y. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. **J Exp Med.** 2000 v.191, p:313-20.

HORNG T., et al., The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature*, v.420, p.329-333, 2002

HOSAKA, S., AKAHOSHI, T., WADA, C., KONDO, H., Expression of the chemokine superfamily in rheumatoid arthritis. **Clin Exp. Immunol**, v.97, p.451-457, 1994.

HOUGH Jr. A. J. **Pathology of rheumatoid arthritis and allied disorders**. In: MCCARTY, D. J., KOOPMAN, W.J., ed. Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology. 12th ed., Philadelphia, Lea & Febiger, 1993, p. 737-761.

HUMES, J. L.; SADOWSKI, S; GALAVAGE, M. et al. Evidence for two sources of arachidonic acid metabolites in macrophages. **J. Biol Chem**. v. 257, 1982, p. 1591-1594.

IDOGAWA, H., et al., Progression of articular destruction and the production of tumour necrosis factor-alpha in antigen-induced arthritis in rabbits. **Scand. J. Immunol**. v. 46, p.572-580, 1997.

INTRONA, M., et al. The effects of LPS on expresión of the early "competence" genes JE and KC in murine peritoneal macrophages. V. 138; p. 3891-6; 1987.

ISSEKUTZ, A. C. Role of polymorphonuclear leukocytes in the vascular responses of acute inflammation. **Lab. Invest**. New York, v. 50, n. 6, Jun./1984, p. 605-607.

ISSEKUTZ, A. C.; MOVAT, H. Z. The effect of vasodilatador prostaglandins on polymorphonuclear leukocyte infiltration and vascular injury. **Am J. Pathol**. Philadelphia, v. 107, n. 3, Jun./1982, p. 605-607.

IVASHKIV L.B., Cytokine expression and cell activation in inflammatory arthritis **Adv Immunol**, v.63, p.337-76, 1996.

IWAMOTO, I., et al., Leukotriene B4 mediates substance P-induced granulocyte infiltration **J. Immunol**, v.151, p. 2116-23, 1993.

JACOBSEN, S. Separation of two different substrate for plasma kinin- forming enzyme. **Nature**. v. 338, p. 225-228, 1989.

JAMES GW, CHURCH MK. Hyperalgesia after treatment of mice with prostaglandins and arachidonic acid and its antagonism by anti-inflammatory-analgesic compounds. **Arzneimittelforschung**. v. 28(5), 1978, p. 804-807.

JENSEN, K.; ANDERSEN, H. O.; OLESEN, J.; LINDBLON, U. Pressure pain threshold in humans temporal region: Evaluation of a new pressure algometer. **Pain**, v. 25, 1987, p. 313-323.

JOHNSON GB, et al., Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. **J Immunol.**, v.168, p.5233-5239, 2002.

JOOSTEN L.AL., et al., Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra. **Arthritis Rheum**. v. 39, p.797-809. 1996.

JOOSTEN LA., et al., Association of interleukin-18 expression with enhanced levels of both interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in knee synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**. v. 48, p.339-347, 2003.

JOOSTEN LA., et al., Toll-like receptor 2 pathway drives Streptococcal Cell Wall-induced joint inflammation: Critical role of myeloid differentiation factor 88. **J. Immunol**, v.171, p.6145-6153, 2003

JOOSTEN, L.A., HELSEN, M.M., VAN DE LOO, F.A., and VAN DE BERG, W.B., Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF- α , anti-IL-1 α/β , and IL-1Ra. **Arthritis Rheum**, v. 39, p.797-809, 1996.

JOOSTEN, L.A., et al., Interleukin-18 promotes joint inflammation and induces interleukin-1-driven cartilage destruction. **American J. Pathol**, v.165, p. 959-67, 2004.

JOSE, P.J., et al. Measurement of the chemotactic complement fragment C5a in rheumatoid synovial fluids by radioimmunoassay: role of C5a in the acute inflammatory phase. **Am. Rheum. Dis**. V.49, p.747-52, 1990.

JULIUS, D., BASBAUM,A.I., Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, 2001, p. 203-210.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H. JESSEL, T. M. The perception of pain. In: **Principles of neural science**, 4ª ed. EUA : MacGraw-Hill, cap. 24, 2000, p. 472-491.

KAPLAN, A. P. Chemokines, chemokine receptors and allergy. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 124; p. 423-31; 2001.

KAPLAN, R.; ROBINSON, C. A.; SCAVULLI, J. F.; VAUGHAN, J. H. Propranolol and the treatment of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 23, 1980, p. 253-255.

KAPP, A., ZECK-KAPP, G., et al. The chemokine RANTES is more than a chemoattractant: characterization of its effect on human eosinophil oxidative metabolism and morphology in comparison with IL-5 and GM-CSF. **J Invest Dermatol**, v. 102; p. 906-14; 1994.

KASAMA, T., et al. Interferon gamma modulates the expression of neutrophil-derived chemokines. **J Invest Med**. v.43, p.58-67, 1995.

KASAMA, T., et al. Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. **J Clin Invest**, v.95; p. 2868-76; 1995.

KATO, H., et al., Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. **Immunity**, v.23, p.19-28, 2005.

KAWAI T., et al., Lipopolysaccharide stimulates the MYD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. **J. Immunol**, v.167, p.5887-5894, 2001.

KAWAI, T., et al. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. **Immunity**, v.11, p.115-22, 1999

KAWAMURA T, YAMAUCHI T, KOYAMA M, MARUYAMA T, AKIRA T, NAKAMURA N. Expression of prostaglandin EP2 receptor mRNA in the rat spinal cord. **Life Sci.**; v.61, 1997, p. 2111-2116.

KELLGREN J.H. Some painful joint conditions and their relation to osteoarthritis. **Clinical Science**. v.4,1939, p.193-205.

KEYSTONE EC, SCHORLEMMER HU, POPE C, e ALLISON AC. Zymosan-induced arthritis: A model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis Rheum.** v. 20, 1977, p. 1396-1401.

KITSIS, E.; WEISSMANN, G. **Clinical Orthopaedics and Related Research.** v. 265, 1991, p. 63-72.

KLICKSTEIN LB, SHAPLEIGH C, GOETZL EJ. Lipoxygenation of arachidonic acid as a source of polymorphonuclear leukocyte chemotactic factors in synovial fluid and tissue in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. **J Clin Invest.** v.66, 1980, p.1166-70.

KOCH, A.E., et al. Macrophage inflammatory protein-1 α : A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest.** v. 93; p. 921-28; 1994

KOHNO, K.; et al. IFN- γ inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. **J. Immunol.** v. 158, 1997, p. 1541-1550.

KOMAI-KOMA M, GRACIE JA, WEI XQ, XU D, THOMSON N, MCINNES IB, LIEW FY. Chemoattraction of human T cells by IL-18. **J Immunol.** 2003 v.170, p:1084-90.

KOMATSU, S.; FLORES, S.; GERRITSEN, M. E.; ANDERSON, D. C.; GRANGER, D. N. Differential upregulation of circulation soluble and endothelial cell intercellular adhesion molecule-1 in mice. **Am J. Pathol.** v. 151, 1997, p. 205-2??.

KOPP, S., The influence of neuropeptides, serotonin, and inflammation. **J. Oral Maxillofac Surg,** v.56, p.189, 1998.

KURIHARA Y, ENDO H, AKAHOSHI T, KONDO H. Up-regulation of prostaglandin E receptor EP2 and EP4 subtypes in rat synovial tissues with adjuvant arthritis. **Clin Exp Immunol.** v.123, 2001, p. 323-330.

KYBURZ, D., et al., Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides activate synovial fibroblasts by toll-like receptor signaling **Arthritis Rheum.** v. 48, p. 642-50, 2003.

LAING, K. J., and SECOMBES, C. J. Chemokines Dev. Comp. **Immunol**, v. 28; p. 443-60; 2004.

LARRIVÉE, J.F., BACHAVAROV, D.R., HOULE, F., LANDRY, J., HUOT, J., MARCEAU, F., Role of the mitogen-activated protein kinase in the expression of the kinin B₁ receptors induced by tissue injury. **J. Immunol**. v. 160, 1998, p. 1419-1426.

LEE, E.K., et al. Essential roles of Toll-like receptor-4 signaling in arthritis induced by type II collagen antibody and LPS. **International Immunology**, v. 17, p.325-33, 2004.

LEHRER, R. L.; GANZ, T.; SELSTED, M. E.; BABIOR, B. M.; CURNUTTE, J. T. Neutrophils and host defence. **Ann. Int. Med.** v. 109, 1988, p. 127-142.

LEUNG BP, CULSHAW S, GRACIE JA, HUNTER D, CANETTI CA, CAMPBELL C, CUNHA F, LIEW FY, MCINNES IB. A role for IL-18 in neutrophil activation. **J Immunol**. 2001 v.167, p. 2879-86.

LEVINE, J. D.; DARDICK, S. J.; ROIZEN, M. F.; HELMES, C.; BASBAUM, A. L. Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis. **J. NeuroSci.**, v. 6, 1986a, p. 3423-3429.

LEVINE, J. D.; et al. Hyperalgesic Properties of 15-lipoxygenase products of arachidonic acid. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 83, 1986, p. 5331-5334.

LEVINE, J. D.; FYE, K.; HELLER, P.; BASBAUM, A. L.; WHITING-O' KEEFE, Q. Clinical response to regional intravenous guanethidine in patients with rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 13, 1986b, p. 1040-1043.

LEVINE, J.D., LAU, W., et al., Leukotriene B₄ produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. **Science**, v. 225, p.743-45, 1984.

LEWIS, G.P.; Plasma kinins and inflammation. **Metabolism**. v.13, 1964, p. 1256-1263,.

LOESER, JD. Perspectives on pain: In Turner P, ed. **Proceedings of the First World Congress on Clinical Pharmacology and Therapeutics**, London: Macmillan, 1980, p. 316-45.

LOESER, John D.; MELZACK, Ronald. Pain: an overview. **The Lancet**. v. 353, 1999, p. 1607-1609.

LOL, L.; et al. Effects of regional guanethidine infusion in certain painful states. **J. Neurol. Psychiatry**. v. 43, 1980, p. 446-471.

LOL, L.; NATHAN, P. W. Painful peripheral states and sympathetic blocks. **J. Neurol. Psychiatry**. v. 41, 1978, p. 664-671.

LORENZETTI, B. B.; et al. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. **Eur. Cytokine New**. v. 13, 2002, p. 456-461.

MACKAY, C.R., Chemokines: immunology's high impact factors. **Nat Immuno**, v. 2, p.95-101, 2001.

MACMILLAN, R. M.; FOSTER, S. J. Leukotriene B₄ and inflammatory disease. **Agents Actions**. v. 24, 1988, p.114-119.

MAINI, R.N., et.al., TNF-alpha in rheumatoid arthritis and prospects of anti-TNF therapy **Clin. Exp. Rheumatol.**, v.8; p.173-5, 1993.

MAKAROV, S.S., OLSEN, J.C., JOHNSTON, W.N., ANDERLE, S.K., et al., Suppression of experimental arthritis by gene transfer of interleukin 1 receptor antagonist Cdna. **PNAS**, v. 93, p. 402-406, 1996.

MALDONADO, R.; VALVERDE, O.; TURCAUD, S.; FOURNIE-ZALUSKI, M. C.; ROQUES, B. P. Antinociceptive response induced by mixed inhibitors of enkephalin catabolism in peripheral inflammation. **Pain**. v. 58(1), 1994, p. 77-83.

MALECH, H. L.; GALLIN, J. I. Neutrophils in human diseases. **N. Engl. J. Med.** v. 317, 1987, p. 687-694.

MANDEL, R. J.; COLMAN, R. W.; KAPLAN, A. P. Identification of prekalikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v.73, 1976, p. 4179-4183.

MANTOVANI, A.; DEJANA, E. Modulation of endothelial function by interleukin-1. **Biochem. Pharmacol.** v. 36, 1998, p. 301-305.

MARCEAU, F. Kinin B1 receptors: a review. **Immunopharmacology.** v. 30(1), June, 1995, p.1-26.

MARCEAU, F.; HESS, J. F.; BACHVAROV, D. R. The B₁ receptors for kinins. **Pharmacol. Rev.** v.50, p.357-386, 1998.

MATSUKAWA, A., YOSHIMURA, T., et. al., IL-8 induces destruction of cartilage and production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in vivo. **J. Immunol**, v. 154, p. 5418-5425, 1995.

MATSUKAWA, AT., et al., Neutrophil accumulation and activation by homologous IL-8 rabbits: IL-8 induces destruction of cartilage and production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in vivo. **J. Immunol**, v.154, p.5418-25, 1995

MC EWEN C.A. The genesis of pain from joint. **Res Neur Ment Dis Proc.** v. 23, 1943, p. 245-51.

McGETTRICK AF., et al., The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll receptor signal transduction. **Mol Immunol**, v.41, p.577-582, 2004

MCLNNES, IB, et al., Interleukin-18: a novel cytokine in inflammatory rheumatic disease. **Arthritis Rheum.** v.44, p.1481-3. 2001.

MCLNNES, IB., et al. Interleukin-18: a therapeutic target in rheumatoid arthritis? **Arthritis Res Ther.**v.7, p.38-41. 2005.

MEDZHITOV, R., et al., Innate immunity: the virtues of a nonclonal system for recognition. **Cell**, v. 91, p.295-98, 1998.

MEINECKE I, RUTKAUSKAITE E, GAY S, PAP T. The role of synovial fibroblasts in mediating joint destruction in rheumatoid arthritis. **Curr Pharm Des.** v. 11,2005, p. 563-8.

MELZAK, R.; WALL P. D. Pain mechanism: a new theory. **Science**. v. 150, 1965, p. 971-979.

MENKE, J. G.; BORKOWSKI, J. A. ; BIERILO, K. K. ; MACNEIL, T. ; DERRICK, A. W. ; SCHNECK, K. A. ; RANSOM, R. W. ; STRADER, C. D. ; LINEMEYER, D. L. ; HESS, J. F. **J. Biol. Chem.** v. 267, 1994, p. 21583-21586.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of chronic pain**. Seattle: International Association for the Study of Pain Press, 1994, p. 210.

MEYLAN E. et al., RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. **Nat Immunol**, v.5, p.503-507, 2003.

MITANI Y, HONDA A, JASIN HE. Polymorphonuclear leukocyte adhesion to articular cartilage is inhibited by cartilage surface macromolecules. **Rheumatol Int.** v.20, 2001, p.180-5.

MOHR, W., WESSINGHAGE, D. The relationship between polymorphonuclear granulocytes and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. **Z. Rheumatol.** v. 37 (3-4), Mar-Apr, 1978, p. 81-6.

MOHR, W.; WESTERHELLWEG, H.; e WESSINGHAGE, D.; Polymorphonuclear granulocytes in rheumatic tissue destruction. III. An electron microscopic study of PMNs at the pannus-cartilage junction in rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.** v. 40, 1986, p. 396.

MOILANEN E. Prostanoids and leukotrienes in rheumatoid synovitis. **Pharmacol Toxicol.** Review. v.75, 1994, p. 4-8.

MÖLLER, K. Ä.; JOHANSSON, B.; BERG, O. G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **J. Neurosci. Meth.**, v. 84, 1998, p. 41-47.

MORGAN, B.P. The complement system: an overview. **Methods Mol Biol** v.150, p. 1-13, 2000.

MORGAN, E.L., et al. Identification and characterization of the effector region within human C5a responsible for stimulation of IL-6 synthesis. **J. Immunol.** v.148, p.3937-42, 1992.

MORHAM SG, LANGENBACH R, LOFTIN CD, TIANO HF, VOULOUMANOS N, JENNETTE JC, MAHLER JF, KLUCKMAN KD, LEDFORD A, LEE CA, SMITHIES O. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. **Cell**. v.83, 1995,p.473-82.

MOTA, I. The mechanism of action of anaphylatoxin. Its effect on guinea pig mast cells. **Immunology**. v. 2, 1959, p. 403-413.

MURPHY, P. M. Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.7; p. 47-64; 1996.

MURRAY, K.M. & DAHL, S.L. Recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75) Fc fusion protein (TNFR:Fc) in rheumatoid arthritis. **Ann Pharmacother**, v.31, p: 1335-1338, 1997.

MUZIO, M., et al., IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. **Science**, v.278, p.1612-15, 1997.

NADE S, NEWBOLD PJ. Factors determining the level and changes in intra-articular pressure in the knee joint of the dog. **J. Physiol**. v. 338, 1983, p. 21-36.

NADE S, NEWBOLD PJ. Pressure-volume relationships and elastance in the knee joint of the dog. **J. Physiol**. v. 357, 1984, p. 417-439.

NAGAKURA, Y.; OKADA, M.; KOHARA, A.; KISO, T.; TOYA, T.; IWAI, A.; WANIBUCHI, F.; YAMAGUCHI, T. Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics. **J. Pharmacol Exp. Ther**. v. 306(2), 2003, p. 490-497.

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H.. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Pharmacology**. v. 135, 1987, p. 145-153.

NAKAMURA, M.; LICO, M.C. Peripheral analgesic effect of clonidine in awaken guinea pig. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 17, 1985, p.406-409.

NAMBAL, T.; OIDA, H.; SUGIMOTO, Y.; KAKIZUKA, A.; NEIGISHI, M.; ICHIKAWA, A.; NARUMIYA, S.; cDNA clonig of a mouse prostacyclin receptor. **J. Biol. Chem.**, v.269, 1994, p. 9986-9992.

NANKI T, et al., Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. **J Immunol**. 2000 v.165, p. 6590-8.

NARUMIYA S, SUGIMOTO Y, USHIKUBI F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiol Rev**. Review. v.79; 1999; p.1193-226.

NASU, T., FUKUDA, Y., NAGAHIRA K, et al., Fucoidin, a potent inhibitor of L-selectin function, reduces contact hypersensitivity reaction in mice. **Immunol Lett**, v. 59, p. 47-51, 1997.

NASU, T.; FUKUDA, Y.; NAGAHIRA, K.; KAWASHIMA, H.; NOGUCHI, C.; NAKANISHI, T.; Fucoidin, a potent inhibitor of L-selectin function, reduces contact hypersensitivity reaction in mice. **Immunol. Lett**. v. 59, 1997, p. 47-51.

NEOTE, K., et al. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of C-C chemokine receptor. **Cell**, v. 72; p. 415-25; 1993

NI, A.; CHAO, J. Transcription factor nuclear factor NF- κ B regulates the inducible expression of the human B₁ receptor gene in inflammation. **J. Biol. Chem**. V. 273, 1998a , p. 2784-2791.

NICHOLSON, A., FEARON D. T; AUSTEN KF. Complement. In: Vane JR, Ferreira S. H, eds. **Handbook of experimental pharmacology**. Berlin: Springer Verlag, 1978, p. 425-440.

NICOL, G. D.; CUI, M. Enhancement by prostaglandin E₂ of bradykinin activation of embryonic rat sensory neurons. **J. Physiol**. (London), v. 480, 1994, p. 485-492.

NINOMIYA-TSUJI, J., et al., The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. **Nature**, v. 398, p.252–256, 1999

NOBACK, C.R., STROMINGER, N.L., DMAREST, R.J. The human nervous system: structure and function. **Pain and temperature**, 5^a ed. New York, Williams & Wilkins, cap. 8:123-137, 1996.

NORDAHL, S., ALSTERGREN, P., KOPP, S., Tumor necrosis factor-alpha in synovial fluid and plasma from patients with chronic connective tissue disease and its relation to temporomandibular joint pain. **J. Oral Maxillfac Surg**, v.58, p.525-30, 2000.

O'NEILL, L.A.J., GREENE, C., Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects and plants. **Jr Leukocyte Biology**, v.63,p.650-657, 1998

OGURA, N., TOBE, M., SAKAMAKI, H., et al., Tumor necrosis factor- α increases chemokine gene expression and production in synovial fibroblasts from human temporomandibular joint. **J. Oral Pathol Med**, v.34, p.357-63, 2005.

OIDA H, NAMBA T, SUGIMOTO Y, USHIKUBI F, OHISHI H, ICHIKAWA A, NARUMIYA S. In situ hybridization studies of prostacyclin receptor mRNA expression in various mouse organs. **Br J Pharmacol**. v.116,1995, p. 2828-37.

OKA,T., AOU,S., HORI,T., Intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta induces hyperalgesia in rats. **European Jr of Pharmcaology**, v.624, p. 61-68, 1993

OKAMURA Y, et al., The extra domain A of fibronectina activates Toll-like receptor 4. **J Biol Chem.**, v.276, p. 10229-10233, 2001.

OKAMURA, H.; et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. **Nature** (Lond). v. 378, 1995, p. 88–91.

OLIVER, S.J., BRAHN, E.; Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. **J. Rheum.** v. 23, 1996, (supl 24), p. 56-60. .

OMOTE K, KAWAMATA T, NAKAYAMA Y, YAMAMOTO H, KAWAMATA M, NAMIKI A. Effects of a novel selective agonist for prostaglandin receptor subtype EP4 on hyperalgesia and inflammation in monoarthritic model. **Anesthesiology**. v. 97, 2002, p.170-176.

OSHIUMI, H., et al., TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. **Nat. Immunol.** v. 4, p.161–167, 2003

OZINSKY A, UNDERHILL DM, FONTENOT JD, HAJJAR AM, SMITH KD, WILSON CB, SCHROEDER L, ADEREM A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **PNAS**. v.97, 2000, p.13766-71.

PALSSON-MCDERMOTT et al., Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor 4 **Immunology**, v.113, p..153-162, 2004

PARDO, E.G. RODRIGUEZ, R. Reversal by acetylsalicylic acid of pain induced functional impairment. **Life Science**. v. 5, 1966, p. 775-781.

PARK CC, MOREL JC, AMIN MA, CONNORS MA, HARLOW LA, KOCH AE. Evidence of IL-18 as a novel angiogenic mediator. **J Immunol**. 2001 v.167, p:1644-53.

PEICHL, P., et al. Presence of NAP-1/IL-8 in synovial fluids indicates a possible pathogenic role in rheumatoid arthritis. **Scand J Immunol**, v. 34; p. 333-39; 1991.

PERKINS, M. N.; KELLY, D.; Induction of bradykinin B₁ receptors in vivo in a model of ultra-violet irradiation-induced thermal hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol**. v. 110, 1993, p.1441-1444.

PERKINS, M. N.; KELLY, D.; Interleukin-1 beta induced-desArg⁹ bradykinin-mediated thermal hyperalgesia in the rat. **Neuropharmacology**. v. 33, 1994, p. 657-660.

PETTIPHER ER, SALTER ED, BRESLOW R, RAYCROFT L, SHOWELL HJ. Specific inhibition of leukotriene B₄ (LTB₄)-induced neutrophil emigration by 20-hydroxy LTB₄: implications for the regulation of inflammatory responses. **Br J Pharmacol**. 1993 v.110, p: 423-7.

PETTIPHER, E.R., HIGGS, G.A., and HERDENSEN, B., Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. **PNAS** v. 83, p. 8749-8753, 1986

PIERER, M., et al., Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands. **J. Immunol**. v. 172, p. 1256, 2004.

PILLEMER, L.; ECKER, E. E. Anticomplementary factor in fresh yeast. **J. biol. Chem**. V. 137, 1941, p. 139-142.

PIOVEZAN AP, D'ORLEANS-JUSTE P, TONUSSI CR, RAE GA. Endothelins potentiate formalin-induced nociception and paw edema in mice. **Can J Physiol Pharmacol.** v.75,1997, p.596-600.

PIRCIO, A.W., FEDELE, C.T., BIERWAGEN, M.E. A new method for the evaluation of analgesic activity using adjuvant-induced arthritis in the rat. **Eur. J. of Pharmacol.** v. 31, 1975, p. 207-215.

PLATER-ZYBERK,C., et al., Therapeutic effect of neutralizing endogenous IL-18 activity in the collagen-induced model of arthritis. **J. Clin. Investig**, v.108, p.1825-32, 2001

PODOLIN, P.L., et al., A potent and selective nonpeptide antagonist of CXCR2 inhibits acute and chronic models of arthritis in the rabbit. **J. Immunol.**, v. 169, p.6435, 2002

POOLE, S., CUNHA, FQ., FERREIRA, SH. Hyperalgesia from subcutaneous cytokines. **Cytokines and Pain.**, 1999, p. 59-87.

PRADO, G. N.; TAYLOR, L.; ZHOU, X.; RICUPERO, D.; MIERKE, D. F.; POLGAR, P. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance and signaling-function of the bradykinin B₂ and B₁ receptors. **J. Cell. Physiol.** v. 193, 2002, p. 275-286.

PRADO, W. A. do. Medicamentos analgésicos de ação central. In: **Fundamentos de Psicofarmacologia** / GRAEFF & GUIMARÃES. cap. 9, 1999. p. 175-195.

PROBERT, L. D., PLOWA, G., et al., The type I interleukin-1 receptor acts in series with tumor necrosis factor (TNF) to induce arthritis in TNF-transgenic mice. **Eur J Immunol**, v.25, p. 1794, 1995

RAFFA RB, SCHUPSKY JJ, JACOBY HI. Endothelin-induced nociception in mice: mediation by ETA and ETB receptors. **J Pharmacol Exp Ther.**; v. 276, 1996, p.647-651.

RAJARTHANAM, K. I. CLARK-LEWIS 1H NMR solution structure of an active monomeric interleukin-8. **Biochemistry**, v. 34; p.12983-90, 1995

RAMOS, A. M. O.; SOARES, M. L. M.; ROCHA, L. R. M.; JERÔNIMO, S. M. B.; ROCHA, F. A. C. da; PATRÍCIO, F. R. S. Zymosan-induced arthritis in rats:

histopathological, histochemical and biochemical study of the articular cartilage. **Rev. Bras. Reumatol.** v.41, 2001, p.205-211.

RAMOS, C. D. L. **Tese de doutorado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, p. 66-67, 2006.

REGINATO AM, SANZ-RODRIGUEZ C, DIAZ A, DHARMAVARAM RM, JIMENEZ SA. Transcriptional modulation of cartilage-specific collagen gene expression by interferon gamma and tumour necrosis factor alpha in cultured human chondrocytes. **Biochem J.** 1993 v. 294, p:761-9.

RIBEIRO, R. A. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic in mice. **Eur. J. of Pharmacology.** v. 387, 2000, p. 111-118.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain and antinociception: current concepts. **Z. Rheumatol.**, v.60, 2001, p. 404-415.

ROCHA FA, ANDRADE LE, RUSSO M, JANCAR S. PAF modulates eicosanoids and TNF release in immune-complex arthritis in rats. **J Lipid Mediat Cell Signal.** v..16, 1997, p.1-10.

ROELOFS MF., Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TRL-4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **J Immunol.**, v.176, p.7021-7027, 2006.

ROLLINS, B.J. Chemokines. **Blood**, v.9; p. 909-28; 1997

ROSENTHALE, M.E., KASSARICH, J., SCHENEIDER J.R.,F. Effect of anti-inflammatory agents on acute experimental synovitis in dog. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* v.122, 1966, p. 693-696.

ROUBIN, R.; MENCIA-HUERTA, J.; BENVENISLE, J. Biosynthesis of platelet activating factor. (PAF-ACETHER). **Eur.J. Immunol.** v. 129, 1982, p. 809-813.

ROUZER, C. A.; FORD-HUTCHINSON, A. W.; MORTON, H. E.; GILLARD, J. W. MK886, a potent and specific leukotriene biosynthesis inhibitor blocks and reverses the membrane association of 5-lipoxygenase in ionophore-challenged leukocytes. **J. Biol. Chem.** v. 265, 1990, p. 1436-1442.

RUBANYL, G., M. Vascular effects of oxygen-derived free radicals. **Free Radical Biol. Med.** v.4, 1988, p. 107-120.

RUTH JH, ROTTMAN JB, KATSCHKE KJ JR, QIN S, WU L, LAROSA G, PONATH P, POPE RM, KOCH AE. Selective lymphocyte chemokine receptor expression in the rheumatoid joint. **Arthritis Rheum.** v.44, 2001, p. 2750-260.

RYCKE De L., et al., Tumor necrosis factor α blockade treatment down-modulates the increase systemic and local expression of Toll-like receptor 2 and Toll-like 4 in spondylarthropathy. **Arthritis Rheum**, v.52, p.2146-58, 2005.

RYSECK, R. P.; et al. Cloning and sequence of a secretors protein induced by growth factors in mouse fibroblastos. **Exper. Cell. Res.** 1989, p. 180-266.

SACRE SM., et al., the Toll-like receptors adaptor proteins MYD88 and MAL/TIRAP contribute to the inflammatory and destructive processes in a human model of rheumatoid arthritis. **The Americam Journal of Pathology.** V170, p.518-525, 2007

SAFIEH-GARABEDIAN, B., POOLE, S., et al., Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol** v.115, p.1265, 1995.

Saklatvala J Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. **Nature.** v.322, 1986, p. 547-9

SAVILL, J. Apoptosis in resolution of inflammation. **J. Leukoc. Biol.** v.61, 1997, p. 375-380.

SAVILL, J. S.; WHYLLIE, A. H.; HENSON, J. E.; WALPORT, M. J.; HENSON, P. M.; HASLETT, C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. **J. Clin. Invest.** v.83, 1989, p. 865-875.

SCHAEFER L, et al., The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptor 4 and 2 in macrophages. **J Clin Invest**, v.276, p.2223-2233, 2005.

SCHAIBLE HG, GRUBB BD. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. **Pain.** Review. v.55,1993, p.5-54.

SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. F. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. **J. Neurophysiol.** v. 60, n. 6, Dec./1988, p. 2180-2195.

SCHAIBLE, H.G; EBERSBERGER, A. e BANCHET, G.S.V. Mechanisms of pain in arthritis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 966, 2002, 343-354.

SCHMELZ, M.; SCHMIDT, R.; RINGKAMP, M.; HANDWEKER, H. O.; TOREBJORK, H. E. Sensitization of insensitive branches of C nociceptors in human skin. **J. Physiol.** (Lond), v. 480, 1994, p. 389-394.

SCHWEIZER A., et al., Interleukin-1 enhances pain reflexes. Mediation through increased prostaglandin E2 levels. **Agents Actions**, v.25, 1988, p. 246-51.

SCOTT DL, et al.,The distribution of fibronectin in the pannus in rheumatoid arthritis. **Br J Exp Pathol.**, v.62, p.362-368, 1981

SCOTT, W. A.; ZRIKE, J. M.; HAMILL, A. L.; KEMPE, J.; COHN, Z. A. Regulation of arachidonic acid metabolites in macrophages. **J. Exp. Med.** v. 152(2),1980, p. 324-335.

SEIBL R, BIRCHLER T, LOELIGER S, HOSSLE JP, GAY RE, SAURENMANN T, MICHEL BA, SEGER RA, GAY S, LAUENER RP. Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. **Am J Pathol.** v.162, 2003, p.1221-7.

SHEN, X. Y., et al. Lipopolysaccharide-induced expression of the competence gene KC in vascular endothelial cells is mediated through protein kinase C. **J. Cell Physiol**, v. 140, 1989, p. 44-51.

SICUTERI, F.; et al. Sorotonin-bradykinin potentiation on the pain receptors in man. **Life Sci.** v. 4, 1965, p. 309-316.

SILVESTRI T, MELICONI R, PULSATELLI L, DOLZANI P, ZIZZI F, FRIZZIERO L, BORZI RM, FACCHINI A. Down-modulation of chemokine receptor cartilage expression in inflammatory arthritis. **Rheumatology** (Oxford). v.42, 2003, p.14-8.

SLATER, T. F. Free-radical mechanisms in tissue injury. **Biochem. J.** v. 222, 1984, p. 1-15.

SMITS, G. J.; MCGRAW, D. E.; TRAPANI, A. J. Interaction of ANP and bradykinin peptide during endopeptidase 24.11 inhibition: renal effects. **Am. J. Physiol.** v. 258, 1990, p. F1417-F1424.

SNYDER, F. Platelet-activating factor and its analogs: metabolic pathways and related intracellular processes. **Biochem Biophys Acta.** v. 1254, 1995, p. 231-249.

SOMMER, C.; et al. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. **Exp. Neurol.**,v. 51, 1998, p. 138-142.

SPETH C, et al. The complement system: pathophysiology and clinical relevance. **Wien Klin Wochenschr** v.111, p.378-91, 1999.

STERANKA, L.R. et al. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. **Neurobiology.** v. 85, 1988, p. 3245-3249.

SU, S.B., et al. Preparation of specific polyclonal antibodies to a C-C chemokine receptor, CCR1, and determination of CCR1 expression on various types of leukocytes. **J. Leukoc Biol**, v. 60; p. 658-66; 1996.

SUNG,C. S., WEN, Z. H., et al., Intratecal interleukin-1 β administration induces thermal hyperalgesia by activating inducible nitric oxide synthase expression in the rat spinal cord. **Brain Research**, v.1015, p.145-153, 2004.

SUZUKI, N, et al., Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signaling in mice lacking IRAK-4. **Nature**, v. 416, p.750-56, 2002.

SZEKANECZ, Z., KIM, J., KOCH, A.E. Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. **Semin Immunol**, v. 15, p.15-21, 2003.

TAKEDA, K., et al., Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.** v. 21, p. 335-76, 2003

TAKEUCHI O, AKIRA S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. **Int Immunopharmacol.** 2001 v.4, p:625-35.

TARTAGLIA, L.A. & GOEDDEL, D.V. Two TNF receptors. **Immunol. Today**, v. 13, p. 151–153, 1992

TAUSCHKE, E.; HELMES, E.; MERSKEY, H. Evidence that defence mechanisms are more related to personality than to symptoms. **Br. J. Med. Psychol.** V. 64 (Pt 2), Jun./199, p. 1137-1146.

TAYLOR, S.M., et al. Reversibility of tachyphylaxis to C5a in guinea pig tissues, perfused human placental lobule, and umbilical artery. V.18, p.645-57, 1994.

TERATO K, et al., Induction by chronic autoimmune arthritis in DBA/1 mice by oral administration of type II collagen and Escherichia coli lipopolysaccharide. **Br J Rheumatol.**, v. 35, p. 828-838, 1996.

TERATO K., et al., Induction by chronic autoimmune arthritis in DBA/1 mice by oral administration of type II collagen and Escherichia coli lipopolysaccharide. **Br J Rheumatol**, v.35, p. 828-38, 1996.

TING E. et al., Role of complement C5a in mechanical inflammatory hypernociception: potential use of C5a receptor antagonists to control inflammatory pain. **Br. J. Pharmacol** v.153, p. 1043-53, 2008

TOBE, M., OGURA, N., ABIKO, Y., and NAGURA, H., Interleukin-1 β stimulates interleukin-8 production and gene expression in synovial cells from human temporomandibular joint. **J. Oral maxillofac Surg**, v. 60, p. 741-747, 2002

TONUSSI CR, FERREIRA SH. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**. v.48, 1992, p.421-7.

TONUSSI CR, FERREIRA SH. Tumour necrosis factor-alpha mediates carrageenin-induced knee-joint incapacitation and also triggers overt nociception in previously inflamed rat knee-joints. **Pain**. v.82, 1999, p. 81-7.

TOSHCHAKOV V. et al., TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1 alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. **Nat. Immunol**, v.3, p.392-398, 2002.

TRANG LE, GRANSTROM E, LOVGREN O. Levels of prostaglandins F2 alpha and E2 and thromboxane B2 in joint fluid in rheumatoid arthritis. **Scand. J. Rheumatol.** v. 6(3), 1977, p. 151-154.

TSAI, Wan C.; et al. Lung-specific transgenic expression of KC enhances resistance to klebsiella pneumoniae in mice. American Association of Immunologies. **The Journal of Immunology.** v. 161, 1998, p. 2435-2440.

UNDERHILL, D. M., et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature.** v. 401, p. 811-815, 1999.

USHIO S., et al., Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein. . **J. Immunol.** v.156, p.4276-79, 1996.

VALE, M. L., et al. Anti-nociceptive effect of thalidomide on zymosan-induced experimental articular incapacitation. **Eur J Pharmacol.** v. 536; p. 309-17; 2006.

VAN ARMAN, G.C, CARLSON, R.P., RISLEY, E.A., THOMAS, R.H., NUSS, G.W. Inhibitory effects of indomethacin, aspirin and certain other drugs on inflammations induced in rat and dog by carrageenan, sodium urate and ellagic acid. **The J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 175, 1970, p. 459-468.

VAN DEN BERG, W.B., JOOSTEN, L.A., et al., amelioration of established murine collagen-induced arthritis with anti-IL-1 treatment . **Clin. Exp. Immunol.** v. 95, p. 237-243, 1994.

VARGAFTIG, B.B., and FERREIRA, S.H. Blockade of the inflammatory effects of platelet-activating factor by cyclo-oxygenase inhibitors. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v.14, p. 187-89, 1981

VERRI JUNIOR, W. **Hipernociceção mecânica induzida pela interleucina-18: Participação de endotelinas e de migração leucocitária.** Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Departamento de Farmacologia, Ribeirão Preto, 2003.

VERRI WA JR, SCHIVO IR, CUNHA TM, LIEW FY, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Interleukin-18 induces mechanical hypernociception in rats via endothelin acting on

ETB receptors in a morphine-sensitive manner. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 310(2), 2004, p. 710-717.

VERRI, W.A. et al., IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. **PNAS** v. 105, p. 2723-28, 2008

VIRELLA, G.; LOPES-VIRELLA, M. F. L.; SHULER, T.; SHERWOOD, G. A.; ESPINOZA, G. A.; WINOCOUR, P.; COLWELL, J. A. Release of PAF by human polymorphonuclear leucocytes stimulated by immune complexes bound to sepharose particles and human erythrocytes. **Immunol.** v. 50, p. 43-49, 1983.

Wang CR, Liu MF. Regulation of CCR5 expression and MIP-1alpha production in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis. **Clin Exp Immunol.** 2003 v.132, p. 371-398.

WANKOWICZ, Z., et al., Synergy between tumour necrosis factor α and interleukin-1 in the induction of polymorphonuclear leukocyte migration during inflammation. **J. Leukocyte Biol**, v.43, p.349-56, 1988

WATKINS LR., et al., Characterization of cytokine-induced hyperalgesia, **Brain Reserarch**, v.654, p.15-26, 1994

WATKINS, L.R., et al., Illness-induced hyperalgesia is mediated by spinal neuropeptides and excitatory amino acids. **Brain Res.** v.654, p. 15-26, 1994.

WATKINS, L.R., et al., Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. **Brain Res.** v.692, p. 244-50, 1995.

WEDMORE CV, WILLIAMS TJ. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. **Nature.** v.289, 1981, p. 646-50.

WEINBLATT, M.E., et al., A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. **N Engl J Med**, v.340, p: 253-259, 1999

WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **N. Engl. J. Med.** v. 320, 1989, p. 365.

WEST, A.P., et al., Recognition and signaling by Toll-Like receptors. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v. 5, p. 409-37, 2006.

WHALLEY, E. T.; et al. The effect of kinin agonist and antagonist on the pain response of the human blister base Naunyn Schmiedeberg Arch. **Pharmacolog.** v. 336, 1987, p. 652-655.

WILLIAMS, R.O., et al., Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.89, p. 9784-88, 1992

WILLIAMS, R.O., FELDMANN, M., MAINI, R.N., Antitumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. **PNAS**, v. 89, p. 9784-9788, 1992.

WILLIAMS, T. J. Interactions between prostaglandins, leukotrienes and other mediators of inflammation. **Br. Med. Bull.** v. 39, 1983, p. 239-242.

WILSON SH, SIMARI RD, LERMAN A The effect of endothelin-1 on nuclear factor kappa B in macrophages. **Biochem Biophys Res Commun.** v.286, 2001,p.968-972.

WOODRUFF, T.M., et al. Antiarthritic activity of an orally active C5a receptor antagonist against antigen-induced monoarticular arthritis in the rat. **Arthritis Rheum**, v. 46, p.2476-85, 2002.

YAMAMOTO M et al.,Role of adaptor TRIF in the MYD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. **Science**, v.301, p.640-643, 2003

YAROVINSKY, F., et al., TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. **Science.** v.308, p.1626-9, 2005.

YE, RD., et al., Gene transcription through activation of G-protein-coupled chemoattractant receptors. **Gene Expr**, v.5, p.205, 1996.

YOSHINO S, et al., Reactivation of antigen-induced arthritis in mice by oral administration of lipopolysaccharide. **Scand J Immunol.**, v. 62, p. 117-122, 2005

YOSHINO S., et al., The role of lipopolysaccharide injected systemically in the reactivation of collagen-induced arthritis in mice. **Br J Pharmacol.**, v. 129, p. 1309-1314, 2000.

YOSHINO S., et al., Reactivation of antigen-induced arthritis in mice by oral administration of lipopolysaccharide. **Scand J Immunol**, v.62, p.117-22, 2005.

YOSHINO S., et al., The role of lipopolysaccharide injected systemically in the reactivation of collagen-induced arthritis in mice. **Br J Pahrmacol**, v.129, p.1309-14, 2000.

ZAIFLER, N. N. J. **Rheumatoid arthritis**. In: MCCARTY, D. J., KOOPMAN, W.J., ed. Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology. 12th ed., Philadelphia, Lea & Febiger, 1993, p. 721-763.

ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, P. M.; MCINTYRE, T. M.; Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. **Immunol. Today**, v.13,1992, p.93-100.

ZURIER, R. B.; SAYADOFF, D. M. Release of prostaglandins from human polymorphonuclear leukotriene. **Inflammation**. v. 1, 1975, p. 93-101.

Anexos

Evaluated the participation of Toll-like receptors in joint nociception in mice: participation of MYD88, TNF- α , IL-1 β and KC

Ana T.G. Guerrero¹, Waldiceu A. Verri, Jr.¹, Thiago M. Cunha¹, Mauro Martins Teixeira², Ricardo T. Gazzinelli³, Fernando Q. Cunha¹ & Sérgio H. Ferreira¹

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, 14049-900 – Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

²Department of Biochemistry and Immunology, Institute Biological Sciences, University Federal of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

³Department of Parasitology and Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; [†]René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; and [‡]Division of Infectious Disease and Immunology, Department of Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01655

Author for correspondence: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Present address: Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, 14049-900-Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. Fax: + 55 16 3633-0021, Tel: + 55 16 3602-3222. E-mail address:

Abstract

The present study addressed the participation of Toll-like receptors 2 and 4 and adaptor molecules MYD88 and TRIF in the joint hypernociceptive response induced by zymosan and LPS injected into the tibio-tarsal joint. The mechanisms involved in this phenomenon were also evaluated. It was observed that LPS and zymosan-induced articular hypernociception. And this articular hypernociception are involved the Toll-like receptors 2 and 4, and adaptor molecule MYD88. And the LPS induced joint production of TNF- α , IL-1 β and KC time-dose-dependent manner, the same was observed with zymosan. The mechanism involved in the genesis of this joint hypernociceptive response was investigated. The TNF- α induces the liberation the IL-1 β , KC, prostanoides and sympathetic amines. Furthermore, IL-1 β induces the release of TNF- α , KC, prostanoides and sympathetic amines. Moreover, KC induces the liberation of TNF- α , IL-1 β , prostanoides and sympathetic amines. It seems these cytokines and chemokines support the hypothesis that during articular inflammation, the cytokines and chemokines were released each other in cyclic manner. Finally, prostanoids and sympathomimetic amines were released and sensitize the nociceptors resulting in mechanical articular hypernociception. We results suggest the first time the important role of Toll-like receptors and adaptor molecule and the cyclic participation of cytokines and quimiokines in the joint hypernociception.

Key words: joint pain, arthritis, hyperalgesia, TNF- α , IL-1 β , KC, hypernociception.

Introduction

Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease of unknown etiology associated with chronic inflammation of peripheral joints and joint pain. Movement-induced joint hyperalgesia is a serious burden to patients presenting inflammatory arthropathies [1]. This clinical state (hyperalgesia) is better defined as hypernociception in experimental models since the majority of experimental nociceptive tests do not differentiate hyperalgesia from allodynia since they do not allow detection of loss of specificity of a sensory modality, characteristic of allodynia [2]. Recently, we developed an experimental model of inflammatory joint hypernociception in mice, in which the dorsal flexion of zymosan inflamed tibio-tarsal articulation elicits hypernociception. This method allows direct quantification of this inflammatory related hypernociceptive phenomenon [3]. Today it is generally accepted that proinflammatory cytokines play an important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. TNF- α , IL-1 β and IL-8 (mice keratinocyte-derived chemokine- KC) has been detected in the synovium and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis (CHU et al., 1991, WESTACOTT et al., 1990, DI GIOVINE, et al., 1988, NEIDEL et al., 1995) However, the mechanisms of initiation and perpetuation of the inflammatory cascade in rheumatoid arthritis are still unknown.

Toll-like receptors (TLRs) are a family of pattern recognition receptors that are involved in the recognition of conserved pathogen-associated molecular patterns (AKIRA et al., 2006). They are conserved proteins with an extracellular leucine-rich domain and an intracellular Toll/IL-1 like receptor (TLR) domain. To date, 11 members of the TLR family have been-identified in humans, TLR4 being the first to be described (AKIRA et al., 2004; BEUTLER et al., 2004). This receptor is essential for LPS signalling, TLR-4 has been involved in the recognition of endogenous ligands, such as hsp60, fibronectin and multiple

host protein (AKIRA, et al., 2004; ANDREAKOS et al., 2004). TLR-4 can signal through the adapter protein MyD88 as well as through MyD88-independent pathways, resulting in the activation of various intracellular signaling cascades, which lead to the activation of transcription factors of the nuclear transcription factor κ B and interferon regulatory factor families, which ultimately induce the production of inflammatory mediators (AKIRA et al., 2004; BEUTLER et al., 2004). Although the specific ligands involved in TLR activation during autoimmune disease are unclear, TLR signaling seems involved in the pathogenesis of autoimmune inflammatory diseases, including arthritis (CHOE et al., 2003; ZHAI et al., 2004; BOULE et al., 2004). The expression and function of TLR in rheumatoid arthritis tissues or cells have been studied by different groups. Higher expression of TLR-2 and TLR-4 in synovial tissues has been found in rheumatoid arthritis patients (RADSTAKE et al., 2004).

In the present study, we investigated the involvement of TLR-2 and 4, adapter molecules and the mechanisms involved in the development of joint hypernociception.

2. Material and Methods

2.1 Animals

All experiments were carried out on male C57BL/6, SV129, TNF-R1^{-/-}, TRL-2^{-/-}, MYD88^{-/-}, TRIF^{-/-}, HEPAS and HEJ 20-25 g, from the University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil. Mice were housed in the animal care facility of the School of Medicine of Ribeirão Preto. Mice were taken to the testing room at least 1 h before experiments and were used once. All experiments were double blinded and conducted in accordance with the guidelines of the National Institute of Health on the welfare of experimental animals and with the approval of the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

2.2 Induction of tibio-tarsal joint inflammation

Joint inflammation was induced by administration of zymosan (30 µg) [3], LPS (300ng), TNF-α (1 – 1000pg), IL-1β (100 – 5000pg) and KC (1 – 100ng) diluted in 5 µL of saline and injected into the right tibio-tarsal joint of lightly anaesthetized mice. The substances were injected with a 29 G hypodermic needle inserted into the joint. Control animals received an intra-articular injection of 5 µL sterile saline.

2.3 Articular flexion-elicited hypernociception in the inflamed joint: Assessment by a modified electronic pressure-meter test for mice.

Experiments were performed as previously described by [3], which is a modification of the test described earlier by [22, 23]. In a quiet room, mice were placed in acrylic cages (12 x 10 x 17 cm high) with a wire grid floor 15-30 min before testing for environmental adaptation. Stimulations were performed only when animals were quiet, without exploratory movements or defecation and not resting on their paws. In these experiments, an electronic pressure-meter was used. It consists of a hand-held force transducer fitted with a polypropylene tip (IITC Inc., Life Science Instruments, Woodland Hills, CA, USA). An increasing perpendicular force applied to the central area of the plantar surface induced the flexion of the tibio-tarsal joint. A tilted mirror below the grid provided a clear view of the animal's hind paw. In the electronic pressure-meter test, the intensity of the stimulus was automatically recorded when the paw was withdrawn. The non-nociceptive tip probe area size used to evaluate the movement-elicited hypernociception was 4.15 mm². The flexion-elicited withdrawal threshold is expressed in grams (g).

2.4 Cytokine and chemokine measurements (ELISA)

At indicated times after the inflammation stimuli injection, animals were killed, and the tibio-tarsal joint was removed from the injection and control joint (saline). The samples were homogenized in 500µl of the appropriate buffer containing protease inhibitors, and TNF- α , IL-1 β , and KC levels were determined by ELISA (SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995). The results are expressed as picograms of each cytokine or chemokine per joint.

2.5 Drugs and reagents

Murine recombinant TNF- α , IL-1 β , and human recombinant IL-1ra were provided by the National Institute for Biological Standards and Control (South Mimms, Herfordshire, UK). Recombinant murine KC was purchased from PeproTech (Rocky Hill, NJ). Indomethacin (non-selective cyclo-oxygenase inhibitor) was obtained from Prodome, (Campinas, SP, Brazil); zymosan, guanetidina were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA); DF 2162 was obtained from laboratories of Dompé pharma; LPS was obtained from Sigma (St Louis, MO, USA).

2.6 Statistical analysis

Results are presented as means \pm s.e.m. and are representative of two separate experiments of 5 animals per group. Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the groups and doses at all times (curves) when the hypernociceptive responses were measured at different times after the stimulus injection. The analyzed factors were treatments, time and time *versus* treatment interaction. When there was a significant time *versus* treatment interaction, one-way ANOVA followed by Bonferroni's *t* test was performed for each time. Alternatively, when the hypernociceptive responses were measured once after the stimulus injection, the differences between responses were evaluated by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *t* test. Statistical differences were considered to be significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Participation of toll-like receptors 4 and Toll-like receptors 2 in joint hypernociception in mice.

To investigate the role of toll-like receptors (TLRs) and adaptors molecules to the joint hyperalgesia, we used deficient mice in a experimental model of arthritis to evaluated the hypernociceptive response. The LPS injected into the tibio-tarsal joint induced hypernociceptive joint response. In the MYD88^{-/-} mice the hypernociceptive response was inhibited (82%) (figure 1, panel A), the same was observed in the HEJ mice (86%) (figure 1, panel B). However, the hypernociceptive response observed with TRIF^{-/-} mice and TLR-2^{-/-} mice were the same observed with the WT mice (figure 1, panel A and B). These results suggest that TLR-4 and MYD88 participate the joint hypernociceptive response.

To evaluated the possibility the participation of Toll-like receptors 2 in the joint hypernociceptive response, the zymosan was injected into the tibio-tarsal joint in the TLR-2^{-/-} mice and was observed the reduction the joint hypernociceptive response (67%) (figure 1, panel C). And we were evaluated the participation of adaptor molecules MYD88 was observed the 80% the recovery of threshold (figure 1, panel C). No difference between HEPAS and HEJ mice was observed (figure 1, panel D).

Thus, suggesting that TLR-2 and MYD88 participate the joint hypernociceptive response induced by intra-articular injection of zymosan. These results point to first demonstration the participation of TLRs and adaptors molecules in the joint hypernociceptive response.

3.2. Toll-like receptors and adaptors molecules production the cytokines and quimiokines in joint inflammation.

The toll-like 4 agonist LPS induced the production of KC in the dose-time-dependence manner (figure 2, panel A). And this production was inhibited in the MYD88^{-/-} and HEJ mice. But in the TRIF^{-/-} mice the levels of the KC was the same levels observed in the WT mice (figure 2, panel A). When the evaluated the levels of IL-1 β in the joint was observed enhanced the levels this cytokine the dose-time-dependence manner. The levels of IL-1 β was reduction in the HEJ and MYD88^{-/-} joint. The levels this cytokine wasn't inhibited in the TRIF^{-/-} mice (figure 2, panel B). The same was observed with TNF- α , the levels was enhanced in the 3 and 5 hours. The levels of TNF- α in the MYD88^{-/-} joint was reduced (figure 2, panel C). The levels of TNF- α in the HEJ joint was reduced when compared with HEPAS (figure 2, panel C).

The zymosan, toll-like 2 agonist injected into the tibio-tarsal induced the production of TNF- α , the levels was enhanced in the 3 and 5 hours. The levels of TNF- α in the MYD88^{-/-} joint was reduced (figure 2, panel D). When the evaluated the levels of IL-1 β in the joint was observed enhanced the levels this cytokine the dose-time-dependence manner. The levels of IL-1 β was reduction in the MYD88^{-/-} joint (figure 2, panel E). the levels of KC were determined and the results observed was the enhanced the dose-time-dependence manner (figure 2, panel F). And this production was inhibited in the MYD88^{-/-} mice. These results suggest the participation of MYD88 and toll-like receptors 2 and 4 in the production of KC, IL-1 β and TNF- α .

3.3. The toll-like agonist 2 and 4 induced hypernociceptive response was mediated by TNF- α , IL-1 β and KC.

To investigate the mechanism involved in the joint hypernociceptive response observed with toll-like agonist 2 (zymosan) and toll-like agonist 4 (LPS), we evaluated whether as cytokines TNF- α and IL- β and quimiokine KC were involved in this response. With this end the animals were pre-treated with IL-1Ra (30 mg kg⁻¹, 30 min before i.v., IL-1 receptor antagonist) and DF2162 (15 mg kg⁻¹, 60 min before p.o., CXCR1/2 inhibitor) treatments inhibited joint hypernociceptive response induced by zymosan and LPS (figura 3, panel A and B). To evaluate the participation of TNF- α we used the TNF-RI^{-/-} mice and the joint hypernociception induced by zymosan and LPS was also inhibited (figure 3, panel A and B). These results suggest the participation of TNF- α , IL- β and KC in this joint hypernociceptive response observed with zymosan and LPS.

3.4. Citokines and quimiokines -induced mechanical articular hypernociception in mice.

Articular injection of TNF- α induced articular hypernociception in a dose- and time-dependent manner (1-1000 pg; 1-5 h) (Figure 4, panel A). The maximum hypernociceptive response was observed with the dose of 100 pg of TNF- α . The hypernociception was already significant 1 h after TNF- α injection, reached a plateau at 5 h after articular injection, and returned to control levels by 24 h (Figure 4, panel A). The mechanism involved in TNF- α -induced articular hypernociception was evaluated by the pretreatment of mice with indomethacin (5 mg kg⁻¹ 30 min before i.p., non-selective cyclo-oxygenase inhibitor) [22], guanetidina (30 mg kg⁻¹, 30 min before s.c., sympathomimetic neuron-blocking agent), or with the association of indomethacin and guanetidina. It was observed that indomethacin,

guanetidina or the association of indometacin and guanetidina treatments inhibited TNF- α -induced articular hypernociception (Figure 4, panel B). Furthermore, IL-1Ra (30 mg kg⁻¹, 30 min before i.v., IL-1 receptor antagonist) and DF2162 (15 mg kg⁻¹, 60 min before p.o., CXCR1/2 inhibitor) treatments also inhibited TNF- α -induced articular hypernociception (Figure 4, panel B). To confirm this results the injection of TNF- α stimulated the secretion of KC (Figure 4, panel C) and IL-1 β (Figure 4, panel C). Zymosan induced production of TNF- α and this production was inhibited in the groups trated with DF2162 and IL-1Ra (figure 4, panel C). LPS also induced production of TNF- α and this production wasn't inhibited in the groups treated. These results suggest that TNF- α induces the liberation to another mediators inflammatory.

Articular injection of IL-1 β induced articular hypernociception in a dose- and time-dependent manner (1000-5000 pg; 1-5 h) (Figure 4, panel D). The maximum hypernocieptive response was observed with the dose of 5000 pg of IL-1 β . The hypernociception was already significant 1 h after IL-1 β injection, reached a plateau at 5 h after articular injection (Figure 4, panel D). With the objective to investigated the mechanism involved in IL-1 β -induced articular hypernociception the mice received the pretreatment with indometacin (5 mg kg⁻¹ 30 min before i.p., non-selective cyclo-oxygenase inhibitor) [22], guanetidina (30 mg kg⁻¹, 30 min before s.c, sympathomimetic neuron-blocking agent), or with the association of indomehacin and guanetidina. It was observed that indometacin, guanetidina inhibited IL-1 β -induced articular hypernociception and the association of indometacin and guanetidina treatments results in more inhibition of IL-1 β -induced articular hypernociception (Figure 4, panel E). This results suggest that IL-1 β induces the liberation of prostanoids and sympathomimetic amines, and this mediators sensitize the nociceptors. Furthermore, DF2162 (15 mg kg⁻¹, 60 min before p.o., CXCR1/2 inhibitor) treatment inhibited IL-1 β -induced articular hypernociception (Figure 4, panel E). Moreover, the

response hypernociceptive induced by IL-1 β was inhibited in TNF-RI^{-/-} mice (Figure 4, panel E). The results suggest that IL-1 β -induced hypernociception was dependent that KC and TNF- α . Consistent with this suggesting, IL-1 β induced KC and TNF- α production in joint tibio-tarsal in mice (Figure 4, panel F). Zymosan induced production of IL-1 β and this production was inhibited in the groups treated with DF2162 and in the TNF-RI^{-/-} mice (figure 4, panel C). LPS also induced production of IL-1 β and this production was inhibited in the group treated with DF2162 and TNF-RI^{-/-} mice. These results suggest that IL-1 β induces the liberation to another mediators inflammatory.

Articular injection of KC induced articular hypernociception in a dose- and time-dependent manner (1-100 ng; 1-5 h) (Figure 4, panel G). The maximum hypernociceptive response was observed with the dose of 30 ng of KC. The hypernociception was already significant 1 h after KC injection, reached a plateau at 5 h after articular injection (Figure 4, panel G). With the objective to investigated the mechanism involved in KC-induced articular hypernociception the mice received the pretreatment with indomethacin (5 mg kg⁻¹ 30 min before i.p., non-selective cyclo-oxygenase inhibitor) [22], guanetidina (30 mg kg⁻¹, 30 min before s.c, sympathomimetic neuron-blocking agent), or with the association of indomethacin and guanetidina. It was observed that indomethacin, guanetidina inhibited KC-induced articular hypernociception and the association of indomethacin and guanetidina treatments results in more inhibition of KC-induced articular hypernociception (Figure 4, panel H). this results suggest the participation of prostanoids and sympathomimetic amines in the joint hypernociceptive response. Furthermore, IL-1Ra (30 mg kg⁻¹, 15 min before i.v., IL-1 receptor antagonist) treatment inhibited KC-induced articular hypernociception (Figure 4, panel H). Moreover, the response hypernociceptive induced by KC was inhibited in TNF-RI^{-/-} mice (Figure 4, panel H). The results suggest that KC-induced hypernociception was dependent that IL-1 β and TNF- α . Zymosan and LPS induced production of KC and this

production was inhibited in the groups treated with IL-1Ra and in the TNF-RI^{-/-} mice (figure 4, panel C). Consistent with this suggesting, KC induced IL-1 β and TNF- α production in joint tibio-tarsal in mice (Figure 4, panel I). Taken together, all these data support the hypothesis that during articular inflammation, the cytokines and chemokines were released each other in cyclic manner. Finally, prostanoids and sympathomimetic amines were released and sensitize the nociceptors resulting in mechanical articular hypernociception.

4. Discussion

In the present study, we addressed the role of Toll-like receptors in the genesis of articular inflammatory hypernociception using a novel mice model, which is characterized by inflamed joint movement-elicited hypernociception [3]. Actually, Toll-like receptors and their signalization seem to participate in the genesis of articular inflammatory hypernociception since deficient mice to TLR2, TLR4 and MYD88 reduced the joint hypernociception induced by zymosan or LPS. Reinforcing the experimental approach, it was observed that MYD88 (MYD88^{-/-}), TLR2^{-/-}, HEJ genetically deficient mice presented reduced levels of cytokines TNF- α , IL-1 β and chemokine KC in the joint. These results are in line with other studies demonstrating the participation of TLRs in the production of inflammatory mediators (PIERER et al., 2004, KATTAH et al., 2008). Moreover, genes deletion studies have demonstrated that TLR-4 is principally responsible for lipopolysaccharide (LPS)-induced activation, while TLR-2 is principally responsive to zymosan (HOSHINO et al., 1999; FRASNELLI et al., 2005). TLR-2 and TLR-4 signaling lead to the activation of NF- κ B (ANDREAKOS et al., 2005) and the MAP kinases JNK (TAKEDA et al., 2005) and p38 (MATSUZAWA et al., 2005) through myeloid differentiation factor 88-dependent and independent pathways. Recent studies have demonstrated the increased expression of TLR-2

and TLR-4 on peripheral blood monocytes from patients with rheumatoid arthritis (De RYCKE et al., 2005; IWAHASHI et al., 2004). In a study utilizing immunohistochemistry, both TLR-2 and TLR-4 were found to be expressed in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis (De RYCKE et al., 2005; IWAHASHI et al., 2004; RADSTAKE et al., 2004). Furthermore, in a study using reverse transcriptase-polymerase chain reaction and in situ hybridization, TLR-2 was found to be expressed in the rheumatoid joint and to be up-regulated in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by TNF- α and IL-1 β (SEIBL et al., 2004; KYBURTZ et al., 2003). While the expression of TLR-2 and TLR-4 on synovial tissue macrophages has been documented, quantitative studies have not been performed to examine the level of expression of TLR-2 and TLR-4 on synovial macrophages and to define the response to TLR ligands. These studies are important, because ligands for TLR-2 and TLR-4 have been identified in rheumatoid arthritis synovial tissue by a monoclonal antibody (VAN DER HEIJDEN et al., 2000). Additionally, endogenous mammalian TLR agonist, including fibrinogen, extra domain A of fibronectin, Hsp60 and Hsp70, low molecular weight fragments of hyaluronic acid are expressed in the rheumatoid arthritis joint, and each has been shown to active NF- κ B through TLR-4 and/or TLR-2 (HINO et al., 1995; OKAMURA et al., 2001; TERMEER et al., 2002; WAGNER , 2001). Macrophages, an important component of the innate immune, are the important source of TNF- α and IL-1 β , IL-8 that are pivotal in promoting inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (FIRESTEIN 2004). Moreover, TLR-2 and TLR-4 ligation result in increase activation of rheumatoid arthritis synovial macrophages compared with those from patients with others forms of inflammatory arthritis or compared with control macrophages (HUANG et al., 2007).

Numerous studies reported significant increase in the levels of TNF- α , IL-1 β and KC in human inflammatory diseases that are accompanied by hyperalgesia, including rheumatoid arthritis. Recent studies demonstrated the crucial role of this cytokines and chemiokines in the

genesis of arthritis. In arthritis models, it seems that IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-8 have been markedly elevated in synovial fluid and synovial membranes from patients with rheumatoid arthritis (GUERNE et al., 1989, BARKSBY et al., 2007). These cytokines and chemokines also play a role in the induction of inflammatory pain in mice (CUNHA et al., 2005).

Considering the above-mentioned evidence, it was evaluated the hypothesis that TNF- α , IL-1 β and KC induces hypernociception by dependent mechanism TLR-2 and TLR-4 agonists. In fact, the zymosan- and LPS-induced hypernociception that is inhibited by pre-treatment with IL-1Ra and DF2162. Moreover, in the deficient mice to p55 the hypernociceptive response induced by zymosan or LPS were inhibited too.

The hypernociceptive mechanism of action of cytokines and chemokines participation in articular inflammatory model was investigated. Our group demonstrate that cytokines and chemokines are sequential release in the mechanical hypernociception in mice and rats (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 2005). TNF- α , IL-1 β and KC trigger two basic mechanical hypernociceptive inflammatory pathways: the prostanóide and the sympathetic (POOLE et al., 1999). In both animal species, prostanoide release is stimulated by IL-1 β , because indomethacin blocks the hypernociceptive effect of IL-1 β . However, TNF- α , which stimulates both pathways in rats and only the prostanoids pathway in mice (CUNHA et al., 2005). Furthermore, whereas CINC stimulates only the sympathetic component in rats, KC stimulates both of hypernociceptive pathways in mice (CUNHA et al., 2005). Moreover, in the present results demonstrated that the auto-regulatory release of these cytokines and chemokines in this articular hypernociception. For instance, KC induced the production of IL-1 β and TNF- α in the joint in this model. Matusukawa demonstrated that intra-articular injection of IL-8 induced IL-1 production (MATSUKAWA et al., 1995). The administration of CXCR2 antagonist reduction the levels of TNF- α in the sinovial fluid (PODOLIN 2002). The response hypernociceptive induced by KC was reduced in the TNFR1^(-/-) mice and the

animals treated with IL-1Ra. IL-1 β induced the articular hypernociceptive response that was inhibited in the animal treated with DF2162 and TNFR1^(-/-) mice. And the injection intra-articular this cytokines induced the production of TNF- α and KC. Chondrocytes stimulated with IL-1 β induced the expression of IL-8 and TNF- α receptors (AIDA et al., 2006). The interaction among cytokines and chemokines was evaluated in the present experimental model, there is evidence that TNF- α induced the production of IL-1 β and KC. Our results demonstrated that KC induced the production of TNF- α and IL-1 β . Moreover, IL-1 β induced the production of KC and TNF- α . The administration of DF2162 reduced the TNF- α or IL-1 β induced hypernociception in mice. And the articular hypernociceptive response induced by IL-1 β or KC was reduced in the TNFR1^(-/-) mice. Moreover, the articular hypernociceptive response induced by TNF- α or KC was reduced in the animals treated with IL-1Ra. The articular hypernociceptive response induced by TNF- α , IL-1 β or KC was inhibited that administration of indomethacin and guanethidine (sympathetic blocker) demonstrated the participation of prostanoids and sympathetic pathways in this articular inflammatory model.

Taking together the present results point out the mechanism involved in zymosan (Toll-like 2 agonist) and LPS (Toll-like 4 agonist) mediation of inflammatory joint hypernociception. It seems that TNF- α , IL-1 β and KC mediates hypernociception by auto-regulatory release. action on the peripheral ending of sensory neurons.

Figure 5 summarizes the hypernociceptive action of zymosan and LPS in the present inflammatory model.

Acknowledgments

We thank the excellent technical assistance of Ana K. dos Santos, Giuliana B. Francisco and Sérgio R. Rosa. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), Brazil.

References

1. Kattah, M.G., Wong, M.T., Yocum, D.M., Utz, P.J. (2008) Cytokines secreted In response to Toll-like receptor ligand stimulation modulate differentiation of human TH17 cells. *Arthritis & Rheumatism* 58, 1619-29
2. Verri, W.A., Jr., Cunha, T.M., Parada, C.A., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H. (2006) Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther* 112, 116-38.
3. Guerrero, A.T., Verri, W.A., Jr., Cunha, T.M., Silva, T.A., Rocha, F.A., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Parada, C.A. (2006) Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. *Pharmacol Biochem Behav* 84, 244-51.
4. Pierer, M., Rethage, J., Seibl, R., Lauener, R., Brentano, F., Wagner, U, et al., (2004) Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptors 2 ligands. *J Immunol* 172, 1256-65
5. Takeda K, et al., (2005) Toll-like receptors in innate immunity *Int Immunol*, 17, 1-14
6. Andreaskos E, et al., the Toll-like receptor-nuclear factor kB pathway in rheumatoid arthritis (2005) *Front Biosci* 10, 2478-88
8. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al., (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR-4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR-4 as the LPS gene product. *J Immunol* 162, 3749-52
9. Matsukawa, A., Yoshimura, T., Fujiwara, K., Maeda, T., Ohkawara, S., Yoshinaga, M. (1999) Involvement of growth-related protein in lipopolysaccharide-induced rabbit arthritis: cooperation between growth-related protein and IL-8, and interrelated regulation among TNFalpha, IL-1, IL-1 receptor antagonist, IL-8, and growth-related protein. *Lab Invest* 79, 591-600.
10. Hatano, Y., Kasama, T., Iwabuchi, H., Hanaoka, R., Takeuchi, H.T., Jing, L., Mori, Y., Kobayashi, K., Negishi, M., Ide, H., Adachi, M. (1999) Macrophage inflammatory protein 1 alpha expression by synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 58, 297-302.
11. Iwahashi M, et al., (2004) Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatism*, 52, 2146-58
12. De Rycke L, et al., (2005) Tumor necrosis factor α blockade treatment down-modulates the increase systemic and local expression of Toll-like receptors 2 and Toll-like receptors 4 in spondylarthropathy. *Arthritis Rheumatism*, 52, 2146-58
13. Radstake TR, et al., (2005) Expression of Toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon- γ . *Arthritis Rheumatism*, 50, 3856-65
15. Seibl R, et al., pattern recognition receptors and their involvement in the pathogenesis of arthritis . (2004) *Curr Opin Rheumatol*, 16, 411-18
17. Kyburz D., et al., Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides activate synovial fibroblasts by Toll-like receptor signaling. (2003) *Arthritis Rheum*, 48, 642-50
18. Van der Heijden IM., et al., presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in joints patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. (2000), *Arthritis Rheum*, 43, 593-98

19. Hino K., et al., EDA-containing fibronectin is synthesized from rheumatoid synovial fibroblast-like cells. (1995), *Arthritis Rheum*, 38, 678-83
20. Okamura Y., et al., The extran domain A of fibronectin activates Toll-like receptor. (2001), *J Biol Chem*, 276, 10229-33
21. Termeer C., et al., Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via Toll-like receptor (2002), *J Expe Med*, 195, 99-111
22. Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Silva, J.S., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H. (2005) A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1755-60.
23. Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Vivancos, G.G., Moreira, I.F., Reis, S., Parada, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H. (2004) An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res* 37, 401-7.
24. Wagner H et al., Toll meets bacterial CpG-DNA (2001) *Immunity* 14, 499-502
25. Huang Q., et al., Increased macrophage activation mediated through Toll-like receptors in rheumatoid arthritis (2007) *Arthritis Rheum*, 56, 2192-2201
26. Guerne PA. et al., Synovium as a source of interleukin6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis (1989), *J Clin Inves*, 83, 585-92
27. Barksby SR. et al., the expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory discords (2007), *Clin Experim Immunol*, 149, 217-225
28. Ferreira SH et al., (1988) *Nature*
29. Poole S. et al., (1999) in *Cytokines and Pain*, eds. Watkins, L. R. & Maier, S.f. (Springer, Berlin), pp. 59-87

Legends

Figure 1. Agonist Toll-like 4-LPS and agonist Toll-like 2-Zymosan mediates joint hypernociception. **Panel A-** MYD88^{-/-} and TLR-2^{-/-} deficient mice were received the the tibio-tarsal injection of LPS (300 ng/5 μ L). The flexion-elicited hypernociception was evaluated after 5 h after LPS injection. **Panel B-** HEJ and TRIF^{-/-} deficient mice were received the tibio-tarsal injection of LPS (300 ng/5 μ L). The flexion-elicited hypernociception was evaluated after 5 h after LPS injection. **Panel C -** MYD88^{-/-} and TLR-2^{-/-} deficient mice were received the the tibio-tarsal injection of zymosan (30 μ g/5 μ L). The flexion-elicited hypernociception was evaluated after 5 h after zymosan injection. **Panel D –** HEJ deficient mice were received the the tibio-tarsal injection of zymosan (30 μ g/5 μ L). The flexion-elicited hypernociception was evaluated after 5 h after zymosan injection. The results are expressed as the mean \pm SEM of five animals per group. The symbol * means significant difference when compared with the saline group. # when compared with the LPS or zymosan injected group ($P < 0,05$)

Figure 2. Intra-articular injection of LPS or zymosan –stimulated TNF- α , IL-1 β and KC production in joint tissue. **Panel A:** Concentration of KC in MYD88(-/-), TRIF(-/-) and HEJ deficient mice and wild type (WT) mice joint injected with 5 μ L of LPS or saline (Sal). At 5 h after intra-articular injection, mice were killed and joint tissue samples were extracted for cytokines, wich were measured by ELISA. The results are expressed by the mean \pm SEM of four animals per group * Statistically significant differences compared with the control group ($P < 0,05$). **Panel B:** Concentration of IL-1 β in MYD88(-/-), TRIF(-/-) and HEJ deficient mice and wild type (WT) mice joint injected with 5 μ L of LPS or saline (Sal). At 5 h after intra-articular injection, mice were killed and joint tissue samples were extracted for cytokines, wich were measured by ELISA. **Panel C:** Concentration of TNF- α in MYD88(-/-), TRIF(-/-) and HEJ deficient mice and wild type (WT) mice joint injected with 5 μ L of LPS or saline (Sal). At 5 h after intra-articular injection, mice were killed and joint tissue samples were extracted for cytokines, wich were measured by ELISA. **Panel D:** Concentration of TNF- α in MYD88(-/-) and TLR2(-/-) deficient mice and wild type (WT) mice joint injected with 5 μ L of zymosan or saline (Sal). At 5 h after intra-articular injection, mice were killed and joint tissue samples were extracted for cytokines, wich were measured by ELISA. **Panel E:** Concentration of IL-1 β in MYD88(-/-) and TLR2(-/-) deficient mice and wild type (WT) mice joint injected with 5 μ L of zymosan or saline (Sal). At 5 h after intra-articular injection, mice were killed and joint tissue samples were extracted for cytokines, wich were measured by ELISA. **Panel F:** Concentration of KC in MYD88(-/-) and TLR2(-/-) deficient mice and wild type (WT) mice joint injected with 5 μ L of zymosan or saline (Sal). At 5 h after intra-articular injection, mice were killed and joint tissue samples were extracted for cytokines, wich were measured by ELISA. The results are expressed by the mean \pm SEM of four animals per group * Statistically significant differences compared with the control group ($P < 0,05$).

Figure 3. Mechanical hypernociception induced by intra-articular injection of LPS or zymosan in WT and TNFR1 (p55(-/-) mice: effects of IL-1Ra and DF2162. **Panel A:** Nociceptive response induced by LPS (300ng/5 μ L) in WT mice pretreated with 5 μ L of saline (sal) or p55(-/-) mice and pretreatment of WT mice with 30mg/kg of IL-1Ra delivered i.v., 15mg/kg of DF2162 delivered p.o. The hypernociceptive responses were evaleuated 5 h after LPS intra-articular injection. The results are expressed by the mean \pm SEM of five animals per group. The symbol * means significant difference when compared with the saline group. # when compared with the LPS injected group ($P < 0,05$)

Panel B: Nociceptive response induced by zymosan (30µg/5µL) in WT mice pretreated with 5µL of saline (sal) or p55(-/-) mice and pretreatment of WT mice with 30mg/kg of IL-1Ra delivered i.v., 15mg/kg of DF2162 delivered p.o. The hypernociceptive responses were evaluated 5 h after zymosan intra-articular injection. The results are expressed by the mean ± SEM of five animals per group. The symbol * means significant difference when compared with the saline group. # when compared with the zymosan injected group ($P < 0,05$)

Figure 4: TNF-α, IL-1β and KC induced tibio-tarsal joint hypernociceptive-flexion.

Panel A: Dose-and time-response curves of the hypernociception induced by intra-articular injection of TNF-α (1, 10, 100 and 1000pg/5µl) or saline. The hypernociceptive effects were determined at 1, 3, 5, 7 and 24 h after intra-articular injection of TNF-α. The results are expressed by the mean ± SEM of five animals per group. The symbol * means significant difference when compared with the saline group. **Panel B:** Nociceptive response induced by TNF-α (100pg/5µl) in pretreatment of mice with 30mg/kg of IL-1Ra delivered i.v., 15mg/kg of DF2162 delivered p.o., 5mg/kg indometacina (indo) delivered i.pl., 30 mg/kg guanethidine (GNT) delivered s.c., and indomethacine plus guanetidine. The results are expressed by the mean ± SEM of five animals per group. The symbol * means significant difference when compared with the saline group. # when compared with the TNF-α injected group ($P < 0,05$). **Panel C:** Production of TNF-α in mice intra-articular injected with IL-1β (5n/5µL), KC (10ng/5µL), zymosan (ZYM- 30µg/5µL), zym treated with DF2162, zym treated with IL-1Ra, LPS (300ng/5µL), LPS treated with DF2162, LPS treated with IL1Ra. The results are expressed by the mean ± SEM of five animals per group. The symbol * means significant difference when compared with the saline group. # when compared with the zymosan or LPS injected group ($P < 0,05$). **Panel D:** Dose-and time-response curves of the hypernociception induced by intra-articular injection of IL-1β (100, 1000 and 5000pg/5µl) or saline. The hypernociceptive effects were determined at 1, 3, 5, 7 and 24 h after intra-articular injection of IL-1β. The results are expressed by the mean ± SEM of five animals per group. The symbol * means significant difference when compared with the saline group. **Panel E:** Nociceptive response induced by IL-1β (5000pg/5µl) in TNFR1 (p55(-/-)) mice and pretreatment of WT mice with 15mg/kg of DF2162 delivered p.o., 5mg/kg indometacina (indo) delivered i.pl., 30 mg/kg guanethidine (GNT) delivered s.c., and indomethacine plus guanetidine. The results are expressed by the mean ± SEM of five animals per group. The symbol * means significant difference when compared with the saline group. # when compared with the IL-1β injected group ($P < 0,05$). **Panel F:** Production of IL-1β in mice intra-articular injected with TNF-α (100pg/5µL), KC (10ng/5µL), zymosan (ZYM- 30µg/5µL), zym treated with DF2162, zym in the TNFR1 (p55(-/-)) mice, LPS (300ng/5µL), LPS treated with DF2162, LPS in the TNFR1 (p55(-/-)) mice. The results are expressed by the mean ± SEM of five animals per group. The symbol * means significant difference when compared with the saline group. # when compared with the zymosan or LPS injected group ($P < 0,05$). **Panel G:** Dose-and time-response curves of the hypernociception induced by intra-articular injection of KC (1,10 and 30ng/5µl) or saline. The hypernociceptive effects were determined at 1, 3, 5, 7 and 24 h after intra-articular injection of IL-1β. The results are expressed by the mean ± SEM of five animals per group. The symbol * means significant difference when compared with the saline group. **Panel H:** Nociceptive response induced by KC (10ng/5µl) in TNFR1 (p55(-/-)) mice and pretreatment of WT mice with 30mg/kg of IL-1Ra delivered i.v., 5mg/kg indometacina (indo) delivered i.pl., 30 mg/kg guanethidine (GNT) delivered s.c., and indomethacine plus guanetidine. The results are expressed by the mean ± SEM of five animals per group. The symbol * means significant difference when compared with the saline group. # when compared with the KC injected group ($P < 0,05$). **Panel I:** Production of KC in mice intra-

articular injected with TNF- α (100pg/5 μ L), IL-1 β (5000pg/5 μ L), zymosan (ZYM-30 μ g/5 μ L), zym treated with IL-1Ra, zym in the TNFR1 (p55-/-) mice, LPS (300ng/5 μ L), LPS treated with IL-1Ra, LPS in the TNFR1 (p55-/-) mice. The results are expressed by the mean \pm SEM of five animals per group. The symbol * means significant difference when compared with the saline group. # when compared with the zymosan or LPS injected group ($P < 0,05$).

Figure 5: Representative diagram of the mechanism underling the TLR2, TLR4 mediation of inflammatory hypernociception of the joint. The figure summarizes the essential conclusion of the present study, which shows the role of TLR2 and 4 stimulating hypernociceptive response. And the participation of MYD88 and TNF- α , IL-1 β and KC in this articular hypernociception.

Figure 1

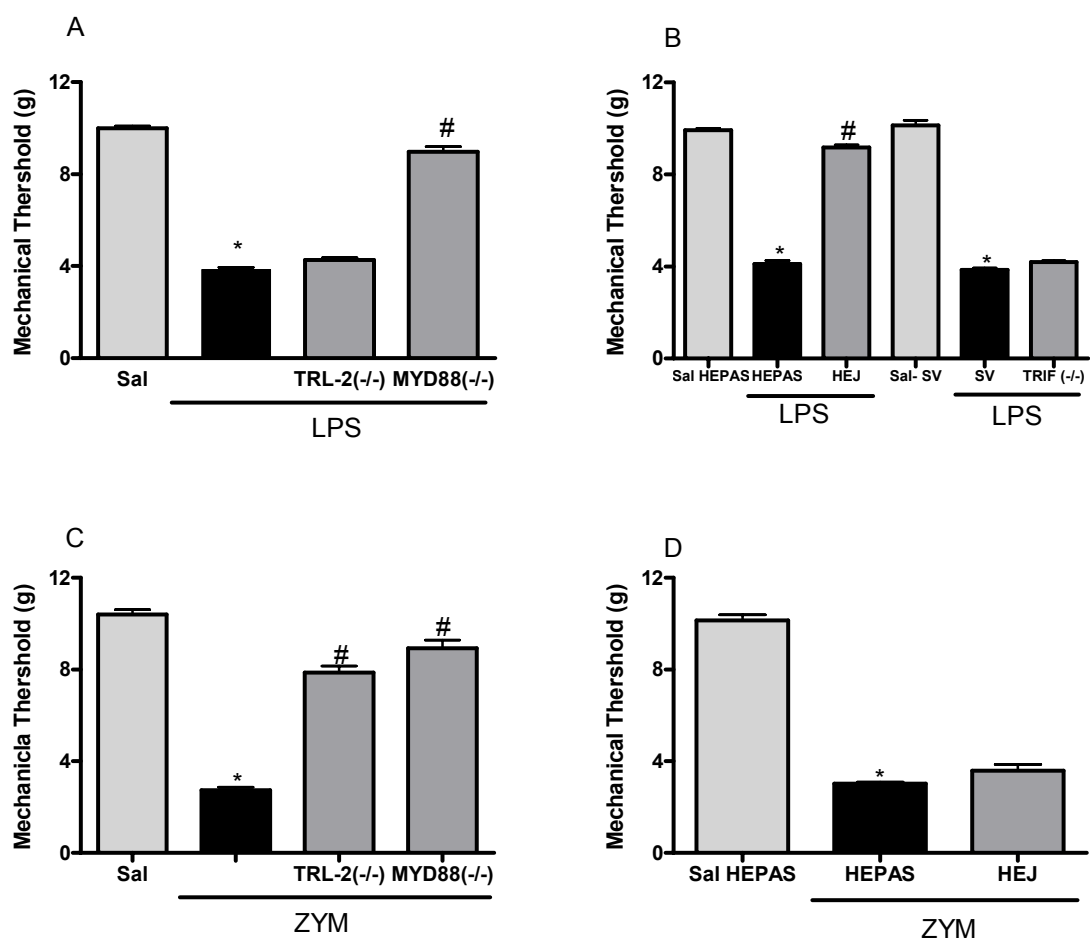


Figure 2

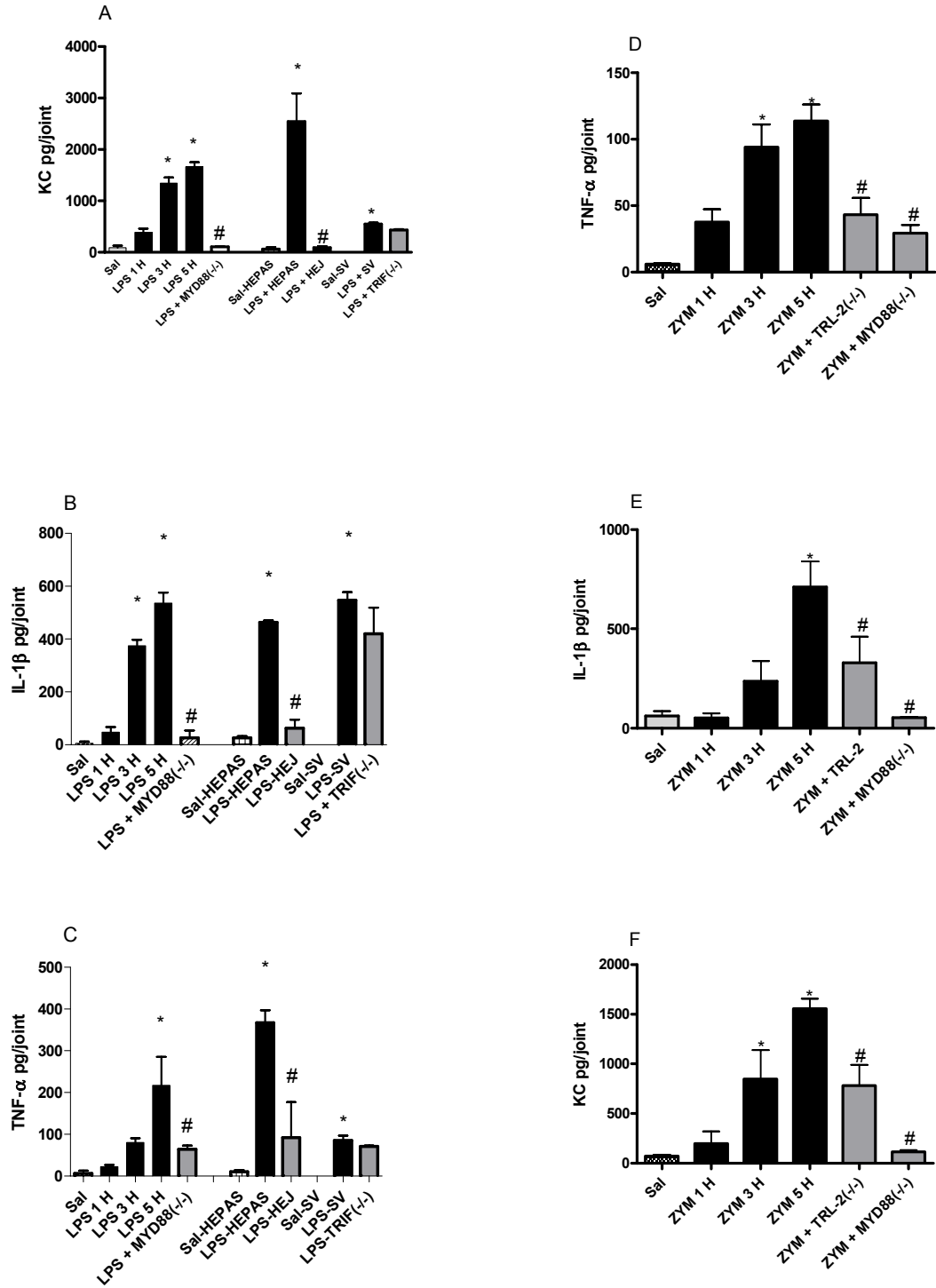


Figure 3

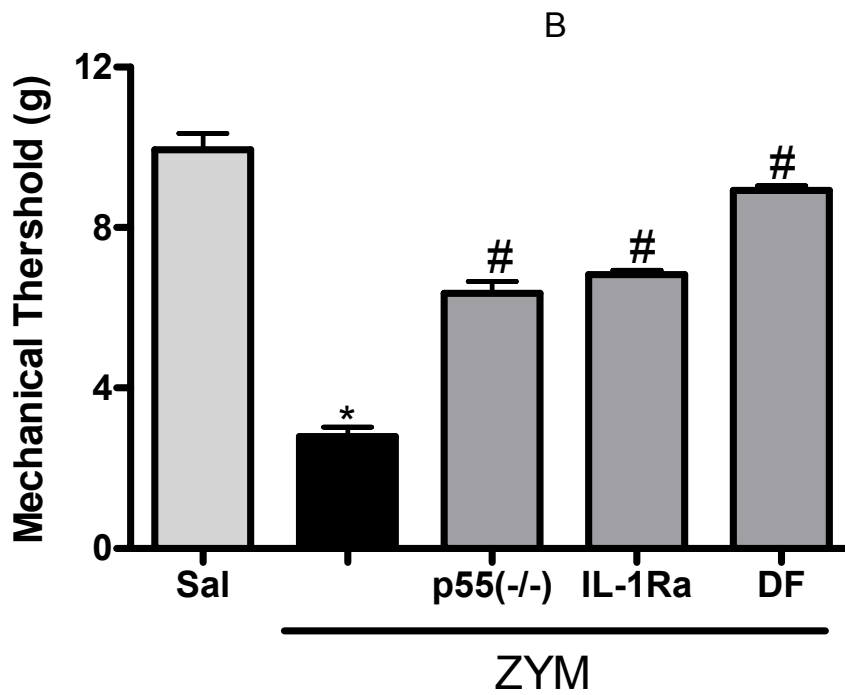
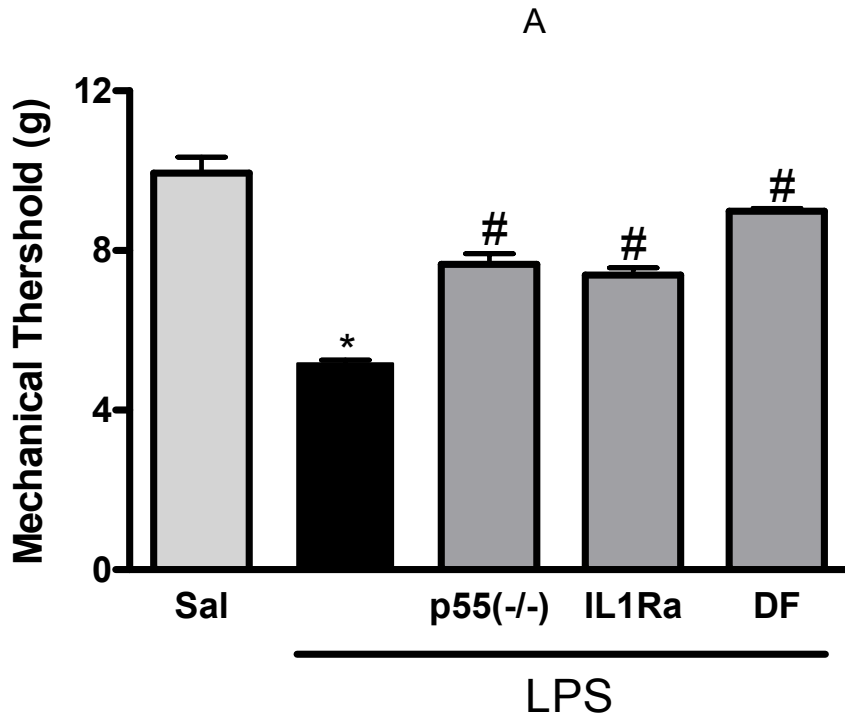


Figure 4

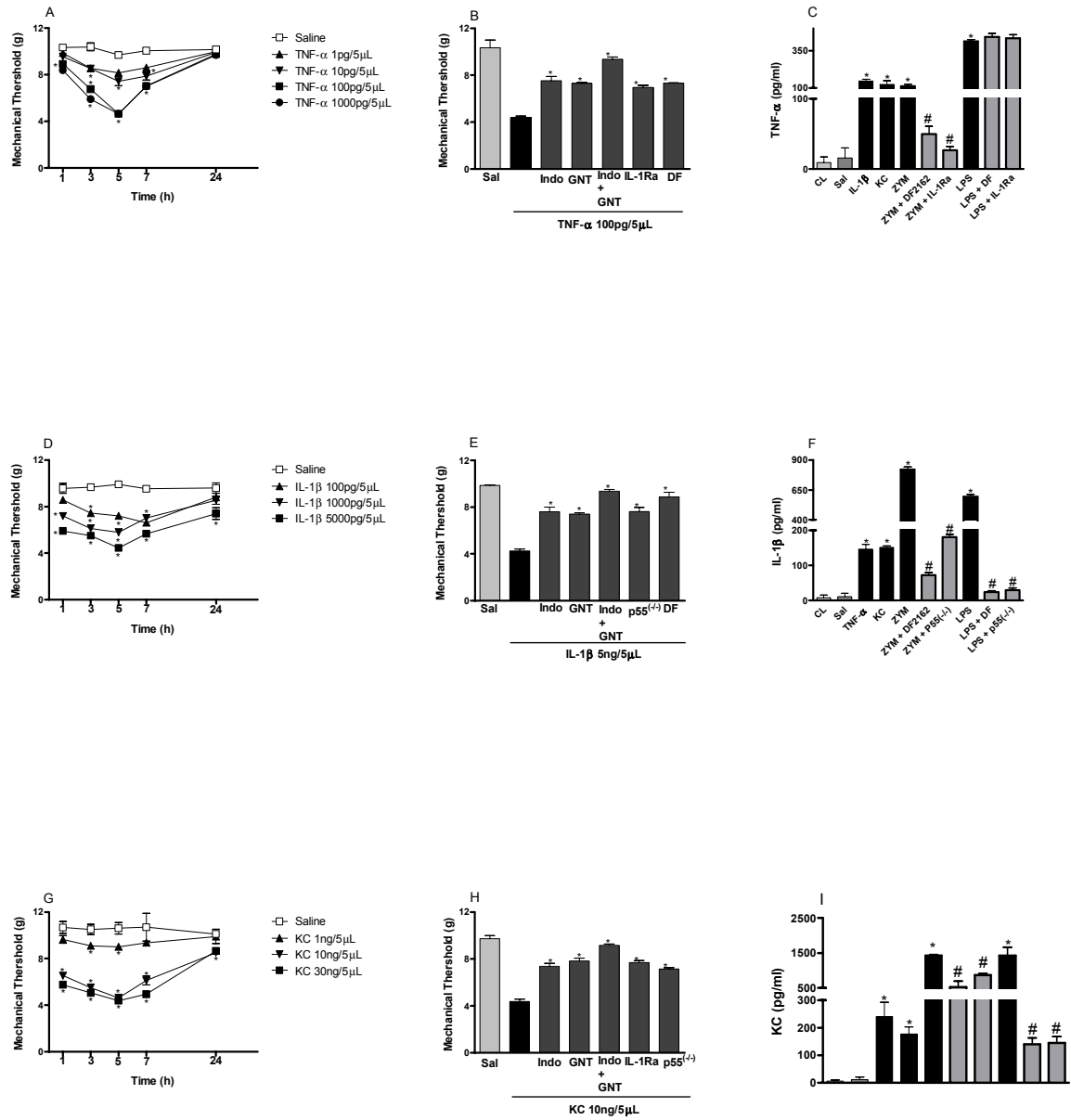
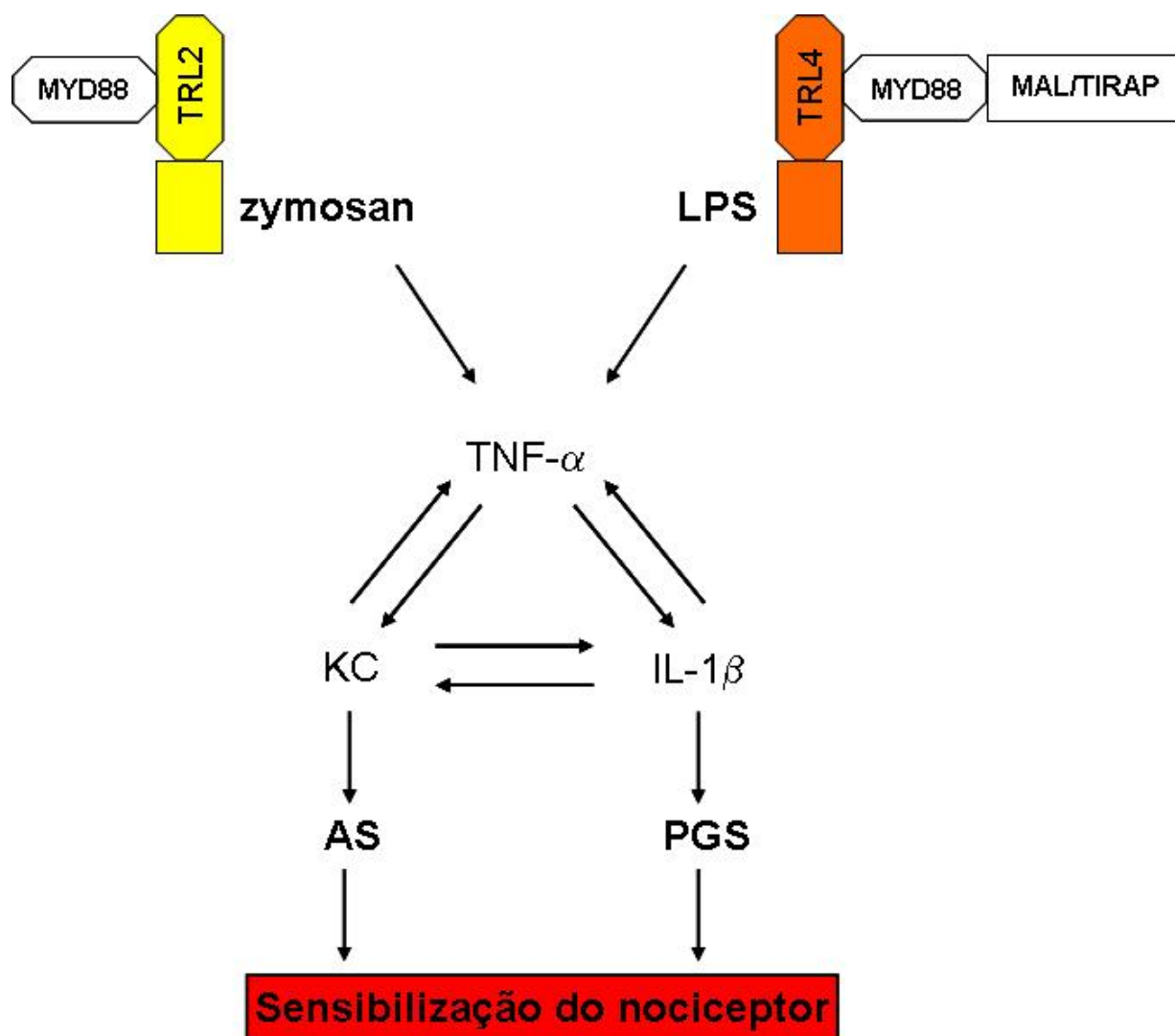


Figure 5



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)